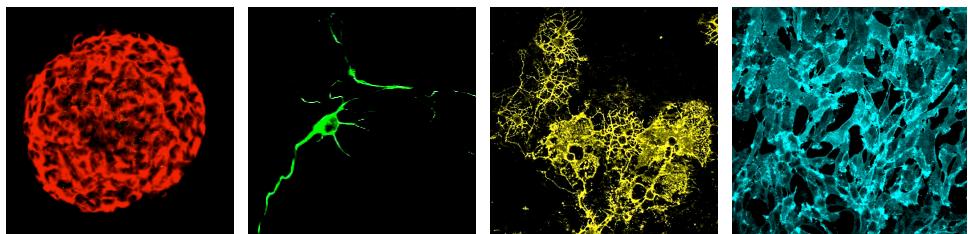

Faculté de Médecine

Giga-Neuroscience

Etude du rôle des isoformes codées par les Neurégulines Nrg-1 et Nrg-2 dans la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses au cours du développement.



Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2009-2010

Dorothée Pirotte

Licenciée en Sciences Biologiques

Après cinq années, nous y voilà ! Cinq ans de gestation (deux éléphanteaux et demi) pour arriver au bout de cette thèse. Comme beaucoup de mes prédecesseurs, j'ai pensé qu'écrire les remerciements était la partie la plus facile et comme beaucoup de mes prédecesseurs je m'aperçois que c'est loin d'être le cas. Au cours de ces années de doctorat, j'ai rencontré de nombreuses personnes qui chacune à leur façon ont contribué à ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Gustave Moonen de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Professeur Bernard Rogister bien que quelques mots ne suffiront pas à exprimer toute ma reconnaissance. Bernard, tu as dès le début guidé mes pas de telle sorte que le petit ourson que je suis finisse par réfléchir avec ses propres neurones. Tes connaissances théoriques et pratiques m'ont grandement aidé tout au long de ce périple. Chef, je te remercie vivement pour ta confiance, ta présence (je suis maintenant immunisée contre le « quoi de neuf ? »), ton optimisme face à mon pessimisme récurrent et surtout pour ta patience. Car je sais qu'il t'en a fallu pour résister à mes coups de sang, mes baisses de régime, mes découragements. Nous n'avons pas toujours été sur la même longueur d'onde, nous n'avons pas toujours les mêmes notions mais tu as toujours été à l'écoute de mes idées, de mes remarques et nos discussions ont toujours été constructives.

Sans Madame Patricia Ernst, pas de cellules et sans cellules, pas d'expériences ! Un grand merci à toi Patricia, pour ta disponibilité face à mes demandes d'oligodendrocytes de dernières minutes ou encore face à mes cultures industrielles de cellules souches nerveuses. Mais également pour ta disponibilité tout court. Je me suis plus d'une fois retrouvée en culture pour des raisons autres que techniques et tu as chaque fois su trouver les mots pour me calmer ou pour me rassurer. Cela a toujours été un plaisir de travailler et de discuter avec toi au quotidien.

Ce doctorat m'a également permis de rencontrer une autre Patricia, la petite Pat. Merci d'avoir partagé avec moi tous ces moments de rire (surtout), d'énerver (parfois), de tristesse (rarement). Nul doute que nos routes ne se sépareront pas de sitôt.

Dans la série des petites, il y a aussi petite Marie avec qui j'ai passé une bonne partie de ma thèse. Inégalable Samantha, merci pour ton énergie et ta bonne humeur au quotidien. Merci aussi pour tes judicieux conseils en biologie moléculaire et pour ton aide.

Décidément, le giga-neuroscience est un repaire de « petits ». Compagnon de galère depuis mon arrivée, le petit Renaud qui est devenu le docteur Vandenbosch. Nous en avons passé du temps à parler de nos manipes, de nos résultats mais également de sujets bien plus personnels. Je te l'ai déjà dit mais je le répète aujourd'hui : je suis vraiment fière et impressionnée, petit Renaud est devenu grand docteur. J'espère que tu vas nous revenir en champion du monde et que tu feras une belle carrière scientifique, tu le mérites.

Au détour d'un couloir, j'ai également rencontré Quentin. De connaissance, tu es vite passé au statut d'ami proche. Les « réalités du terrain » nous ont un peu éloignés et cependant, tu réponds toujours présent quand je lance un appel. Merci également d'avoir fait de moi la « Chantal » du laboratoire, que de bons moments à préparer et à tourner ces vidéos (DVD bientôt disponible dans le commerce...).

J'ai passé ces années de doctorat entourée de la BR Team : merci à Sabine pour toutes nos discussions scientifiques ou non et pour tous nos fous-rires qui font toujours du bien. Merci à Emerence alias Mémé, grande prêtresse des statistiques, qui m'a montré le chemin de l'anova et du test de Tuckey. Merci surtout pour tous nos rires, délires et dérapages en

tout genre (vérifier à gauche, vérifier à droites, vérifier les portes avant de raconter nos conneries). On doit toujours crever les pneus de mister SS !!!

Comment ne pas citer THE petit ours qui se transforme doucement mais sûrement en petit panda ! Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, ton sens de l'humour et ta légèreté. Ca fait plaisir d'avoir quelqu'un qui ne se prend pas au sérieux et qui ne se prend pas la tête. Et bien que ce ne soit pas dans tes projets d'avenir, je persiste à dire : PETIT OURS PRESIDENT.

Je remercie également plusieurs seniors pour leur aide et leurs conseils : Brigitte, Laurent, Pierre, Rachel, Bernard L et Julie

Haaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa, Arlette ! Tout un poème ! Petit bout de femme toute speedée et aux idées bien arrêtées ; qui dit tout ce qu'elle pense, vraiment tout, mais on serait franchement idiot si on se vexait pour si peu hein... Chère Arlette, ce fût un plaisir journalier de discuter avec toi de tout et de rien mais surtout de chien sauf que le mien ne mange pas d'enfants ! Merci pour tout petite Madame Broze.

Un grand merci à Linda qui a eu le courage de reprendre le sujet Neurégulines. Je ne compte plus le nombre de tes questions-réponses immédiates (alors pourquoi tu me poses la question si tu sais la réponse !) ou de tes questions déroutantes (bienvenue dans la quatrième dimension). Mais on a quand même bien rigolé durant ton mémoire et j'espère avoir été un bon guide sur le chemin de la compréhension des Neurégulines et du travail en laboratoire.

Il y a encore une quantité de personnes que j'aimerai remercier mais si je fais encore un paragraphe pour tout le monde, on n'a pas fini journée ! Donc en vrac remerciements : à Morgan-Morice-Bodson parce qu'il est lui tout simplement (que tes oreilles te protègent et inversement), à Beuki qui a toujours su pallier à mes défaillances confocales, à Laurence B qui comprend qu'on puisse adorer un chien, à Ingrid parce qu'elle est folle, à Larisia, Jean-Fi, Murielle, Bernard C, Céline, Oli et Malou (sandwich), Gros Tapas, Aneta, Stéphanie, Laurence deNijs, Sophie-choux et enfin nos techniciennes de choc : Alice et Mélissa

Je remercie très vivement Mamita et Pepito, mes parents, parce que je ne suis qu'un gros bébé cadum qui aura toujours besoin de se faire dorloter. Merci d'être toujours disponibles pour moi. Et je passe le bonjour à ma grosse sœur, la seule à pouvoir m'appeler « crapaude » sans risque.

Je terminerai par Fabjan, mon amoureux. N'étant pas du genre à dire que la vie à tes côtés ressemble à un magnifique couché de soleil perpétuelle, je dirais simplement que je suis bien avec toi. Tu m'apportes tout ce qu'il me faut : une grosse dose de rire, une pointe de calme, un soupçon de limites et ta présence tout simplement. Je ne peux pas ne pas mentionner ma patate, version canine de Moby Dick, cirque ambulant « qui me comble de joie et de bonheur » !!! Longue vie aux patates.

Liste des abréviations

AchR	Récepteur à l'Acéthylcholine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AR	Amphiréguline
ARIA	Acetylcholine Receptor Inducing Activity
ARN	Acide RiboNucléique
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bFGF/FGF2	basic Fibroblast Growth Factor
BTC	Bétacelluline
Chk	C-terminal Src Kinase-homologous Kinase
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMT1	Maladie de Charcot-Marie-Tooth
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CRD-Nrg	Cystein-Rich Domain Neuregulin
CSN	Cellule Souche Nerveuse
DAG	Diacylglycérol
DAPI	Di Aminido Phenyl Indol
DG	Gyrus Denté
dsRNA	ARN double brin
E16	16 ^{ème} jour embryonnaire
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
ECD	Domaine ExtraCellulaire
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tetraacétique.
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Récepteur à l'EGF
EICD	Domaine IntraCellulaire du récepteur ErbB
EPR	Epiréguline
ErbB	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
ES (cellule)	Cellule Souche Embryonnaire
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GDP	Guanine DiPhosphate
GEF	Guanine Exchange Factor
GGF	Glial Growth Factor
Gphn	Géphyrine
Grb2 / 7 (protein)	Growth factor receptor-bound protein 2 / 7
GRP	Progéniteur de lignée gliale
GTP	Guanine TriPhosphate
HB-EGF	Heparin-Binding EGF
ICD	Domaine IntraCellulaire
Ig	Immunoglobuline
IGF	Insulin-like Growth Factor
IP3	Inositol Triphosphate
JNM	Jonction NeuroMusculaire
kDa	KiloDalton

KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBP	<i>Protéine Basique de la Myéline</i>
MMP	<i>Matrix MetalloProtease</i>
mRNA	<i>ARN messager</i>
NDF	<i>Neu Differentiation Factor</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NLS	<i>Signal de Localisation Nucléaire</i>
NMDA	<i>N-méthyl-D-aspartate</i>
Nrg	<i>Neuréguline</i>
NRP	<i>Progéniteur à destinée neuronale</i>
OP	<i>Oligodendrocyte Precursor</i>
P0, P2, P3, P7	<i>Jour post-natal 0, 2, 3, 7</i>
Pb	<i>Paire de bases</i>
PI3K/Akt	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protéine kinase B</i>
PIP2	<i>Phosphatidyl-inositol-diphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidyl-inositol-triphosphate</i>
PKB	<i>Protéine Kinase B</i>
PKC	<i>Protéine Kinase C</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PTB domain	<i>Phospho-Tyrosin Binding domain</i>
RIP	<i>Protéolyse Intramembranaire Régulée</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RRX	<i>Rhodamine Red X</i>
RTK	<i>Récepteur Tyrosine Kinase</i>
SEP	<i>Sclérose-en-plaques</i>
SH domain	<i>Sarc Homology domain</i>
Shc	<i>Src Homologous and Collagen protein</i>
SHP1 / 2	<i>Src homology 1 / 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
siRNA	<i>Silencing RNA</i>
Swi/Snf	<i>SWItch Sucrose NonFermentable</i>
SMDF	<i>Sensory and Motor Neuron Derived Factor</i>
SNC	<i>Système Nerveux Central</i>
SNP	<i>Système Nerveux Périphérique</i>
TACE/ADAM	<i>Tumor necrosis factor α Converting Enzyme /A Disintegrin And Metalloprotease</i>
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor α</i>
ZSV	<i>Zone Sous-Ventriculaire</i>

Table des matières

Chapitre I : Introduction générale 1

<i>Introduction</i>	1
1. <i>Les cellules souches</i>	3
1.1 Les cellules souches embryonnaires	4
1.2 Les cellules souches somatiques	4
1.3 Les cellules souches nerveuses	5
1.3.1 Les cellules souches nerveuses chez l'adulte	5
1.3.2 Caractéristiques des cellules souches nerveuses	6
2. <i>Facteurs extrinsèques et intrinsèques régulant la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses</i>	6
2.1 Les facteurs intrinsèques : régulation de la transcription chez les eucaryotes	7
2.1.1 Régulation épigénique de la mémoire cellulaire par les groupes protéiques Polycomb et Trithorax	7
2.1.2 Régulation de la transcription par les « chromatin remodeling complex » Swi/Snf, BAP et BAF	7
2.1.3 Les facteurs de transcription	10
2.2 Les facteurs extrinsèques : les voies de signalisation	10
2.2.1 La voie de signalisation Wnt	10
2.2.2 La voie de signalisation Hedgehog	12
2.2.3 La voie de signalisation Notch	13
2.2.4 Voies de signalisation par les récepteurs aux cytokines	14
2.2.5 Voies de signalisation par les récepteurs aux membres de la famille du TGF-β	16
2.2.6 Voies de signalisation par les récepteurs à activité tyrosine kinase	18
2.3 Les récepteurs ErbB	21
2.3.1 Les ligands des récepteurs ErbB	24
2.4 Les Neurégulines	25
2.4.1 Structure des Neurégulines	25
2.4.2 Rôles des Neurégulines dans le système nerveux périphérique	28
2.4.3 Rôles des Neurégulines dans le système nerveux central (SNC)	29
2.4.3.1 <i>Les neurones</i>	29
2.4.3.2 <i>Les astrocytes</i>	30
2.4.3.3 <i>Les oligodendrocytes</i>	30
2.4.4 La signalisation bidirectionnelle de CRD-Nrg	31
2.4.5 Les Neurégulines-2	33
2.4.6 Les Neurégulines dans les maladies neurologiques	33
Conclusion	36
Références bibliographiques	37

Chapitre II : CRD-NRG, l'isoforme de type III codée par NRG-1 module la différenciation neuronale et oligodendrogliale des cellules souches nerveuses *in vitro* 46

1 <i>Introduction</i>	46
2. <i>Résultats</i>	47
2.1. Localisation des domaines extra- et intracellulaire	47
2.2. Effet de la modulation de l'expression des neurégulines-1 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses en culture	51
2.3. Interactions protéiques	58
2.4. Rôle de BAF57 dans la stimulation de la différenciation des cellules souches nerveuses par le domaine intracellulaire de Nrg-1	61
Références bibliographiques	65

Chapitre III : Etude de l'expression des isoformes codées par NRG-2 dans des cultures de cellules souches nerveuses. Rôles dans la prolifération et la différenciation..... 66

<i>1. Introduction</i>	<i>66</i>
<i>2. Résultats.....</i>	<i>66</i>
2.1 Localisation des domaines extra- et intracellulaire	66
2.2 Effet de la modulation de l'expression des Neurégulines-2 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses en culture.....	69
2.3 Interactions protéiques	75
<i>3. Matériel et méthodes.....</i>	<i>77</i>
3.1 Anticorps anti-Nrg-2	77
3.2 Dot-Blot	77
3.3 RNA interférence	78
3.4 Construction des vecteurs d'expression pour les domaines extra- et intracellulaires de Nrg-2.....	79
3.4.1 Extraction d'ARN totaux à partir de cervelet de souris.....	79
3.4.2 Amplification des séquences Nrg-2 ECD et ICD par RT-PCR.....	79

Chapitre IV : Discussion..... 81

<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>96</i>
---	-----------

Annexe 1 : La neurogenèse adulte ou l'histoire d'un dogme qui s'écroule

Annexe 2 : Neuregulin-1 modulates the differentiation of neural stem cells in vitro through an interaction with the Swi/Snf complex.

Chapitre I

Introduction générale

Introduction

De nos jours, si la médecine actuelle dispose de traitements de plus en plus efficaces pour arrêter la progression de processus physiopathologiques dans le cas des maladies neurologiques, il n'en va pas de même pour les traitements sensés réparer ou favoriser la réparation du tissu nerveux lésé. Devant cette dramatique absence de régénération qui caractérise le système nerveux central dans l'espèce humaine, les cliniciens ont envisagé déjà depuis plusieurs années la possibilité d'une thérapie cellulaire applicable dans plusieurs situations spécifiques. De manière schématique, on peut individualiser deux approches distinctes dans ce domaine : la **thérapie cellulaire substitutive** et la **thérapie cellulaire neuroprotectrice**. Si la thérapie cellulaire substitutive consiste à greffer des cellules supposées avoir la capacité de remplacer des cellules déficientes d'un point de vue fonctionnel du moins, le but de la thérapie cellulaire neuroprotectrice est de « renforcer » le système nerveux en permettant une survie accrue des cellules nerveuses existantes. Cependant, quel que soit le mode de thérapie cellulaire concerné, cette approche nécessite de pourvoir disposer d'une source cellulaire et cet aspect est d'une importance cruciale dans le cas particulier du système nerveux.

On comprend dès lors mieux dans ce contexte la logique qui a conduit de nombreux chercheurs et cliniciens à considérer **les cellules souches** lorsqu'on envisage les thérapies cellulaires dans le cas des maladies neurologiques. Il est en effet clair qu'elles pourraient représenter une source de neurones humains. Ce problème est particulièrement bien illustré par le seul essai clinique de thérapie cellulaire de maladie neurologique chez l'homme, à savoir la greffe de neuroblastes dopaminergiques au niveau du striatum de patients parkinsoniens. Cet essai imposait l'utilisation de mésencéphale provenant de six à huit embryons par patient (Widner et al., 1992). Les cellules souches, parce qu'elles constituent une réserve cellulaire quasi illimitée grâce à leur capacité d'auto-renouvellement, tout en conservant leur potentiel de différenciation, représentent donc une solution idéale au problème de la source cellulaire lorsqu'on évoque une thérapie cellulaire dans le domaine des maladies neurologiques.

Le fait de se tourner vers les cellules souches comme source de neurones dans les protocoles de thérapie cellulaire substitutive de maladies neurologiques humaines ne résout cependant pas toutes les questions. En effet, rappelons succinctement qu'il existe

plusieurs types de cellules souches, les cellules souches embryonnaires et les cellules souches somatiques (Sylvester and Longaker, 2004; Sato and Nakano, 2001), que le problème d'éventuels tératomes induits par les cellules cultivées et ensuite greffées reste d'actualité (Przyborski, 2005; Grinnemo et al., 2008; Blum and Benvenisty, 2008) et enfin qu'une origine hétérologue des cellules imposera le recours à un traitement immunosupresseur subséquent dont les modalités sont encore loin d'être définies (Andrews, 2002). Dans ces conditions, et bien que cette approche paraisse toujours à priori et actuellement éloignée d'une éventuelle application clinique, il nous paraît primordial de continuer à envisager l'hypothèse d'un recrutement pharmacologique des cellules souches nerveuses endogènes qui persistent tout au long de la vie de l'individu (Miller, 2006). Cette hypothèse de travail a quelque peu été laissée de côté depuis que l'on sait qu'en temps normal, ces cellules sont incapables de participer, même incomplètement, à une régénération tissulaire après lésion cérébrale. Néanmoins, il apparaît aujourd'hui possible de recruter ces cellules souches endogènes, du moins dans une approche expérimentale. En effet, bien que les ischémies cérébrales constituent une cause de séquelles fonctionnelles invalidantes parfois importantes, plusieurs études réalisées montrent que ces mêmes ischémies cérébrales peuvent induire une neurogenèse accrue dans la zone sous-ventriculaire et le *gyrus dentatus* (Tanaka et al., 2004; Kokaia et al., 2006; Yamashita et al., 2006). Plus important encore, cette neurogenèse adulte résultant d'une ischémie a récemment été observée dans le cerveau de patients âgés (Macas et al., 2006; Minger et al., 2007).

Au cours du développement, divers facteurs extrinsèques comme les facteurs de croissance sont indispensables pour que les cellules souches nerveuses puissent proliférer et par la suite se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et neurones. Plusieurs observations permettent de penser que certains de ces acteurs moléculaires actifs au cours du développement puissent, dans certaines conditions physiopathologiques, être à nouveau à l'origine d'une néoformation accrue de neurones chez l'adulte (Felling and Levison, 2003). Dès lors, la compréhension des mécanismes permettant la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses au cours du développement constitue à nos yeux le meilleur prélude d'une compréhension chez l'adulte de ces mêmes mécanismes. Si l'on veut un jour exploiter au mieux le potentiel des cellules souches nerveuses dans diverses thérapies cellulaires visant à la

reconstruction cérébrale ou nerveuse, cette étape de compréhension reste un obstacle dont le franchissement reste indispensable.

C'est dans ce contexte général que s'inscrit ce présent travail. *Nous avons en effet envisagé d'étudier certains aspects du développement du système nerveux central, plus particulièrement certains aspects de la régulation moléculaire du choix d'un destin cellulaire par les cellules souches nerveuses dans le cerveau embryonnaire, afin éventuellement de tenter de les transposer à terme chez l'adulte.*

Dans cette introduction, nous aborderons deux parties : la première sera consacrée au rappel de certains aspects des cellules souches en général en insistant cependant sur les cellules souches nerveuses tandis que la seconde sera consacrée à la synthèse des données disponibles actuellement concernant la régulation moléculaire de certains aspects du développement en général et du développement du système nerveux central en particulier.

1. Les cellules souches

Classiquement, le terme de « cellule souche » désigne une cellule présentant une activité d'auto-renouvellement qui implique qu'au moins une des deux cellules-filles (division asymétrique) ou les deux (division symétrique) hérite(nt) des caractéristiques morphologiques, biochimiques et fonctionnelles de la cellule-mère. Elles sont également capables de générer plusieurs types cellulaires en fonction des conditions environnementales et en fonction de leur nature. Ainsi, schématiquement les cellules souches sont classées en deux grandes catégories : les **cellules souches embryonnaires** ou ES (Embryonic Stem) présentes chez l'embryon depuis le stade zygote jusqu'au moment de la gastrulation et les **cellules souches somatiques** apparaissant lors de la gastrulation et responsables de l'organogenèse chez l'embryon (et chez le jeune individu selon l'organe) mais aussi responsables de l'homéostasie tissulaire chez l'individu adulte. Enfin, mentionnons les cellules **souches germinales** qui s'individualisent tôt au cours de la vie embryonnaire et dont la fonction semble restreinte et uniquement dévolue à la formation des ovules ou des spermatozoïdes selon le sexe de l'individu.

1.1 Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ES) sont isolées à partir des premières divisions de l'ovocyte fécondé et sont dites **totipotentes** du stade zygote jusqu'au stade morula puisqu'isolées, elles sont capables de conduire à la formation d'un nouvel individu complet. Au-delà du stade morula, c'est-à-dire dès le stade blastula, les cellules ES sont dites **pluripotentes** car elles sont toujours capables de se différencier dans tous les tissus qui dérivent des trois feuillets embryonnaires primaires (ectoderme, mésoderme, endoderme). En revanche, les cellules ES isolées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste ne peuvent plus se développer en un embryon complet car elles ne sont pas capables d'adopter le destin trophoblastique qui est à l'origine des annexes embryonnaires (Figure 1.1).

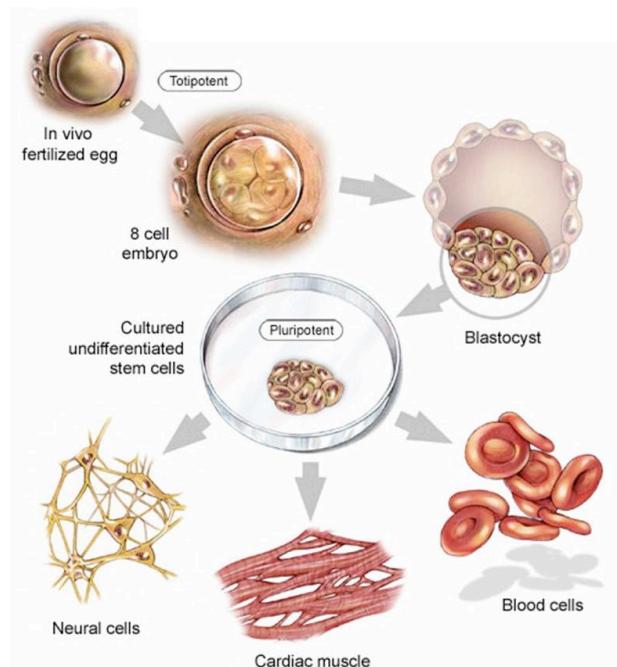


Figure 1.1. Cellules souches embryonnaires ou ES. Le zygote ou les cellules de la morula (illustrée ici au stade « 8 cellules ») constituent des cellules ES totipotentes tandis que les cellules issues de la masse interne du blastocyste, ne peuvent que donner naissance aux divers types cellulaires de l'organisme en fonction de l'environnement dans lequel elles sont cultivées. En revanche, elles sont devenues incapables d'adopter un destin trophoblastique et c'est la raison pour laquelle elles sont dites pluripotentes. Figure adaptée de Gokal-Kochar, 2004.

1.2 Les cellules souches somatiques

Les cellules souches somatiques sont présentes dans tous les tissus dont le système nerveux. Durant l'embryogenèse, leur rôle est d'assurer le développement des tissus et des organes. Par la suite, elles assurent l'homéostasie tissulaire en remplaçant les cellules perdues. Elles sont **multipotentes**, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier dans les différents types cellulaires de l'organe dont elles sont issues. C'est

grâce à cette propriété et à leur auto-renouvellement que les cellules souches somatiques peuvent remplir leur fonction au niveau de l'homéostasie tissulaire. Cependant, il existe à ce niveau des différences importantes selon les organes. En effet, à côté de tissus à haut pouvoir de renouvellement et de réparation comme la moelle osseuse, la peau et la muqueuse digestive, il existe des tissus à faible renouvellement mais à haut pouvoir de réparation ou de recrutement (comme le foie ou la glande mammaire par exemple, celle-ci étant caractérisée par une prolifération du tissu glandulaire au moment de la grossesse) et des tissus à faible renouvellement et faible pouvoir de réparation. C'est notamment le cas du tissu nerveux qui, s'il contient toujours des cellules souches nerveuses (CSN) capables de proliférer et de se différencier *in vitro* en astrocytes, oligodendrocytes et neurones, ne sera pas caractérisé par une néo-formation de neurones chez un individu adulte après une lésion responsable d'une perte neuronale.

1.3 Les cellules souches nerveuses

Au cours de la neurogenèse, les CSN issues du tube neural se divisent d'abord symétriquement durant une première phase d'expansion. Elles se divisent ensuite de façon asymétrique pour donner naissance à une cellule souche et à une cellule progénitrice ayant une capacité limitée de prolifération. En outre, ces progéniteurs sont « restreints », c'est-à-dire que leur différenciation est déjà orientée vers un type cellulaire précis et se déroulera après un nombre déterminé de cycles cellulaires (Raff et al., 1998; Barres and Raff, 1999).

1.3.1 Les cellules souches nerveuses chez l'adulte

C'est à Joseph Altman que l'on doit les premières observations démontrant l'existence d'une neurogenèse dans le cerveau de mammifère adulte. Mais ce n'est qu'au début des années nonante que la démonstration formelle de l'existence d'une neurogenèse adulte à partir de cellules souches nerveuses persistantes est rapportée indépendamment par deux groupes de recherches (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Morshead et al., 1994). Cette neurogenèse adulte se déroule dans deux régions du cerveau, le *gyrus denté* ou *gyrus dentatus* de l'hippocampe (DG), permettant une production limitée de nouveaux neurones au niveau de la région CA1 de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire du télencéphale (ZSV), c'est-à-dire la paroi latérale des ventricules latéraux. En 1998, l'équipe d'Eriksson démontre la présence au niveau du

gyrus dentatus humain de cellules marquées à la fois par un traceur fluorescent incorporé par les cellules en prolifération et par un anticorps dirigé contre un marqueur neuronal. Erikson et coll. venaient donc de démontrer pour la première fois l'existence d'une neurogenèse adulte dans l'espèce humaine (Eriksson et al., 1998). D'autres travaux ont établi par la suite que ces nouveaux neurones produits chez l'animal sont capables de propager un potentiel d'action, de former des synapses fonctionnelles et de s'intégrer dans une voie nerveuse préexistante (van Praag et al., 2002). Une description plus complète de ces données récentes a fait l'objet de notre part d'une revue récente (appendice 1).

1.3.2 Caractéristiques des cellules souches nerveuses

Les CSN prélevées chez l'adulte ou l'embryon sont cultivées la plupart du temps en utilisant un substrat non adhésif. Dans ces conditions, elles forment des agrégats flottants, **les neurosphères**. Si celles-ci sont transférées sur un substrat adhésif et, en l'absence de facteurs de croissance, les cellules adhèrent au substrat, arrêtent leur prolifération et se différencient de façon spontanée dans les trois grands types cellulaires du système nerveux central. De nombreux facteurs de croissance (CNTF, TGF α , GGF2, IGF, Erythropoïétine,...) influencent la destinée des progéniteurs ou cellules souches. De plus, suivant la nature du facteur mitogène ajouté lors de l'étape de culture en suspension, le choix ultérieur du destin cellulaire sera modifié. Ainsi, l'EGF favorisera plutôt l'adoption d'un destin astroglial de ces cellules souches, alors que le bFGF sera plutôt en faveur d'un destin neuronal (Johé et al., 1996; Clarke, 2003).

2. Facteurs extrinsèques et intrinsèques régulant la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses

Au cours du développement, plusieurs facteurs aussi bien extrinsèques qu'intrinsèques jouent un rôle dans la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches nerveuses (Edlund and Jessell, 1999) : c'est la combinaison de ces deux grands types de signaux qui explique la diversité des types cellulaires observés dans le système nerveux. Ainsi, la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses dépend en grande partie d'un phénomène d'inhibition latérale impliquant aussi bien des signaux intrinsèques qu'extrinsèques qui activeront ou inhiberont l'expression de gènes régulant le choix d'un destin cellulaire. Une cellule souche qui se

différencie en un type cellulaire déterminé peut, par l'intermédiaire de diverses voies de signalisation, transmettre cette information aux cellules avoisinantes et ainsi, les empêcher de choisir le même destin cellulaire. **L'inhibition latérale** constitue donc un mécanisme important par lequel la diversité cellulaire est conservée.

2.1 Les facteurs intrinsèques : régulation de la transcription chez les eucaryotes

2.1.1 Régulation épigénique de la mémoire cellulaire par les groupes protéiques Polycomb et Trithorax

Comme nous l'avons signalé plus haut, les CSN par divisions asymétriques peuvent donner naissance entre autres à un progéniteur capable d'effectuer plusieurs cycles cellulaires tout en étant déjà restreint à un destin cellulaire. Il doit donc exister à ce niveau un mécanisme moléculaire permettant au progéniteur et à ses différentes cellules filles de « garder le souvenir » de cette restriction de destin au cours des différents cycles cellulaires. Ces mécanismes de « **mémoire cellulaire** » permettant à la cellule de maintenir la destinée choisie au fil des mitoses successives n'est évidemment pas l'apanage du système nerveux et constitue une caractéristique importante du développement des organismes pluricellulaires.

Divers travaux chez la drosophile ont permis d'identifier les protéines Polycomb (*PcG*) et Trithorax (*TrxG*) comme agents maintenant respectivement silencieuse ou active la transcription de gènes importants au cours du développement, comme les gènes homéotiques (*Hox*) par exemple. La plupart des protéines encodées par *PcG* et *TrxG* agissent sous la forme de complexes multiprotéiques qui modifient les propriétés locales de la chromatine de manière à inhiber ou au contraire à activer la transcription de gènes cibles (Mahmoudi and Verrijzer, 2001b; Ringrose and Paro, 2004).

2.1.2 Régulation de la transcription par les « chromatin remodeling complex » Swi/Snf, BAP et BAF

La structure de la chromatine chez les eucaryotes constitue un des éléments importants permettant l'accessibilité de l'ADN à des processus tels que la transcription ou la réplication (Ehrenhofer-Murray, 2004). Par leur capacité à réguler la structure de la chromatine, les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant (appelés aussi complexe de remodelage chromatinien ou « **moteurs chromatiniens** ») jouent un

rôle critique dans la maintenance, la transmission et l'expression du génome eucaryote (Saha et al., 2006). De façon générale, ces complexes protéiques sont constitués de différentes sous-unités protéiques complémentaires capables *in fine* de modifier les contacts établis entre l'ADN et les histones (Figure 1.2). Dans un second temps, un « **moteur** » central, correspondant à une sous-unité ATPasique, est capable de réaliser une translocation de nucléosomes (Choudhary and Varga-Weisz, 2007; Trotter and Archer, 2007). Chez la levure, on a identifié quatre classes de complexes de remodelage chromatinien dont le complexe Swi/Snf (Simone, 2006; Montecino et al., 2007).

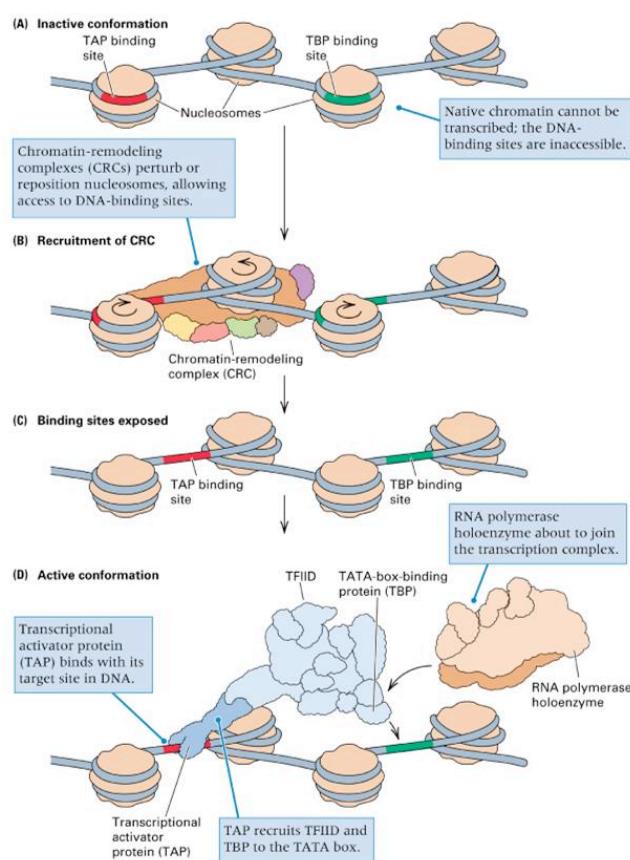


Figure 1.2. Représentation schématique du mécanisme de régulation de la transcription par les complexes de remodelage chromatinien. Ces complexes ont la capacité de réguler la structure de la chromatine en déplaçant les nucléosomes afin de rendre certains gènes accessibles à la machinerie transcriptionnelle. Cette modification de la structure de la chromatine est possible grâce notamment à l'activité ATPasique d'une de ses sous-unités. Cette activité ATPasique est souvent déclenchée par la présence d'un exemplaire d'actine globulaire. Figure adaptée de: Analysis of genes and genomes, 2005 Jones and Bartlett Publishers

Au cours de l'évolution, les homologues de ce complexe sont hautement conservés et correspondent chez la drosophile au complexe BAP et chez les mammifères au complexe BAF. Les moteurs centraux de ces complexes sont dénommés respectivement Swi2/Snf2 chez la levure, BRM chez la drosophile et

BRG1/hBRM chez les mammifères (Figures 1.3 et 1.4). Ces moteurs contiennent en plus du domaine ATPasique une région présentant des homologies avec les hélicases. Leur capacité à dérouler la chromatine et à rendre accessibles les gènes cibles à la machinerie transcriptionnelle fait d'eux des acteurs incontournables de la transcription. A côté de ces domaines catalytiques, certaines sous-unités composant les complexes comportent des domaines d'interactions protéiques, des motifs de liaison à l'ADN, ainsi que des « bromodomains » reconnaissant spécifiquement les lysines acétylées présentes aux extrémités des histones (Mahmoudi and Verrijzer, 2001; Kwon and Wagner, 2007). Ces différents domaines de liaison sont indispensables à l'interaction des complexes avec leurs séquences cibles au niveau de la chromatine. Parmi les différentes sous-unités, plusieurs appartiennent au groupe protéique *TrxG* et sont dès lors impliquées dans le maintien de l'expression de gènes cibles. Ainsi par exemple, la sous-unité BAF57 des mammifères (correspondant à BAP111 chez la drosophile) contient un domaine HMG (High Mobility Group) capable de se lier à l'ADN (Mohrmann and Verrijzer, 2005).

Yeast		Drosophila		Human	
SWI/SNF	RSC	BAP	PBAP	BAF	PBAF
Swi2/Snf2	Sth1	Brahma	Brahma	BRG1 or hBRM	BRG1
Swi1/Adr6		OSA		BAF250	
	Rsc1, Rsc2, Rsc4		Polybromo		Polybromo/BAF180
	Rsc9*		BAP170*		
Swi3	Rsc8	Moira	Moira	BAF170 & BAF155	BAF170 & BAF155
		BAP111	BAP111	BAF57	BAF57
Swp73	Rsc6	BAP60	BAP60	BAF60a	BAF60a or BAF60b
Swp61/Arp7	Rsc11/Arp7	BAP55	BAP55	BAF53	BAF53
Swp59/Arp9	Rsc12/Arp9				
		actin	actin	actin	actin
Snf5	Sfh1	Snr1	Snr1	hSNF5/INI1	hSNF5/INI1

Figure 1.3. Tableau comparatif des différentes sous-unités constituant les complexes de remodelage chromatinien chez la levure, la drosophile et chez l'homme. Adapté de Mohrmann et Verrijzer, 2005

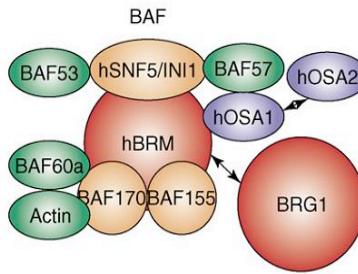


Figure 1.4. Représentation schématique des sous-unités constitutives d'un complexe de remodelage chromatinien. Chez les mammifères, la sous-unité centrale est hBRM ou BRG1 dont l'homologue chez la drosophile est Brahma. Chacune est associée à divers sous-unités dont les fonctions n'ont pas encore été déterminées dans tous les cas. Figure adaptée de Kwon and Wagner, 2007.

Bien que le rôle définitif des Arps (Actin-related proteins) n'est cependant pas encore clairement établi, on a néanmoins suggéré qu'elles pourraient moduler la liaison de ces complexes à la chromatine ou à la matrice nucléaire, stimuler l'activité ATPasique du « moteur », favoriser l'assemblage et la stabilité des complexes, favoriser leur liaison aux histones et donc le remodelage et la translocation des nucléosomes (Mohrmann and Verrijzer, 2005; Shen et al., 2003 ; Rando et al., 2000; Olave et al., 2002).

2.1.3 Les facteurs de transcription

Bien que possédant le même génome, chaque cellule va acquérir sa spécificité. Cette diversité est possible grâce à divers mécanismes de sélections des gènes qui seront exprimés. L'un de ces processus est assuré par les facteurs de transcription qui en se liant directement à l'ADN peuvent activer ou réprimer la transcription de certains gènes. Cependant, nous ne détaillerons pas plus ce vaste sujet qui dépasse le cadre de ce travail.

2.2 Les facteurs extrinsèques : les voies de signalisation

2.2.1 La voie de signalisation Wnt

Au cours du développement embryonnaire, la prolifération, la migration et la polarité des cellules sont contrôlées par de nombreux signaux extracellulaires et parmi ceux-ci, les Wnt jouent un rôle important (Kalani et al., 2008; Nusse et al., 2008). Les Wnt constituent un groupe de glycoprotéines riches en cystéine qui sont sécrétées pour agir de manière paracrine. Le nom de cette famille de morphogènes est né de la contraction des termes « *wingless* » (le gène responsable de l'apparition des ailes chez la drosophile) et « *integrated* » (l'homologue de ce gène chez les vertébrés). Dans la

voie de signalisation Wnt, l'élément le plus important est la β -caténine qui est en fait un facteur de transcription formant un complexe multiprotéique avec l'axine, la Glycogène Synthase Kinase-3 (GSK-3) et APC. En l'absence de la liaison de Wnt sur son récepteur, on observe une interaction entre l'axine et GSK-3 responsable d'une phosphorylation de la β -caténine favorisant ainsi son ubiquitinylation et donc sa dégradation par le protéasome. Cependant, la liaison des Wnt à leurs récepteurs transmembranaires Frizzled conduit à la phosphorylation de la protéine Disheveled (Dsh) qui, en s'associant à l'axine, inhibe la phosphorylation de la β -caténine par GSK-3. Ainsi, la β -caténine peut être transloquée dans le noyau des cellules-cibles des Wnt. Dans le noyau, la β -caténine forme un hétérodimère avec les facteurs de transcriptions LEF ou TCF (Figure 1.5) ce qui lui permet d'activer ou d'inactiver un grand nombre de gènes (Miller et al., 1999; Bienz and Clevers, 2003; He, 2003). Cette voie de signalisation représente ce qu'il est actuellement convenu d'appeler la voie de signalisation canonique.

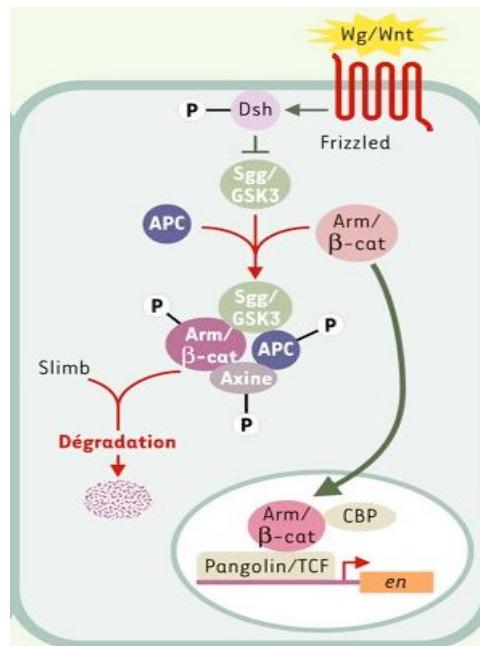


Figure 1.5. Représentation schématique du système de signalisation canonique Wnt. La fixation de la protéine Wnt à son récepteur Frizzled entraîne l'activation de Disheveled et l'inhibition de GSK-3. On observe alors une inhibition de la dégradation de la β -caténine. Celle-ci peut alors être transloquée dans le noyau où elle activera la transcription de gènes-cibles. Figure adaptée de Navarro et Thérond, 2002.

Outre son rôle durant l'embryogenèse, la voie Wnt possède d'autres fonctions au sein de la cellule. Lorsqu'elle n'est pas dégradée, la β -caténine peut également s'accumuler dans le cytoplasme où elle s'associe alors à la cadhérine E et à l'actine du cytosquelette pour s'arrimer au niveau du pôle cytoplasmique des « gap junction » (jonctions adhésives) (Nelson and Nusse, 2004). D'autre part, la protéine Wnt peut

également activer un système non-canonique de signalisation. En effet, après phosphorylation, Dsh peut interagir avec la Rho, une petite protéine commutateur G et donc douée d'une activité GTPasique qui, après échange du GDP en GTP, activera à son tour des kinases phosphorylant des protéines du cytosquelette modulant ainsi la forme, la polarité et la motilité de la cellule (Huelsken and Behrens, 2002; Veeman et al., 2003).

2.2.2 La voie de signalisation Hedgehog

Tant chez les vertébrés que chez les invertébrés, la voie de signalisation Hedgehog régule la prolifération et la différenciation cellulaire au cours du développement (Patten and Placzek, 2000; Marti and Bovolenta, 2002). Tout comme les Wnt, les protéines Hedgehog sont des glycoprotéines sécrétées qui sont codées par le gène *hedgehog (hh)* chez la drosophile et dont il existe trois homologues chez les vertébrés : *sonic hedgehog (shh)*, *desert hedgehog (dhh)* et *indian hedgehog (ihh)*. Sonic Hedgehog est impliqué dans la symétrie gauche-droite durant le stade embryonnaire précoce. En outre, ce morphogène oriente les membres suivant l'axe antéropostérieur et induit la ventralisation du tube neural (Wilson and Maden, 2005). C'est également un facteur nécessaire à la formation des motoneurones (Briscoe and Ericson, 1999) et des neurones dopaminergiques (Perrone-Capano and di, 1996; Wallen and Perlmann, 2003) dont il spécifie également la localisation dans la plaque neurale antérieure (Abeliovich and Hammond, 2007). Produite sous forme de précurseur, la pré-protéine Shh est ensuite clivée en deux domaines : un domaine N-terminal responsable de la signalisation et un domaine C-terminal autocatalytique responsable de l'établissement de l'axe dorso-ventral du système nerveux central (Lupo et al., 2006). Le récepteur des protéines Hedgehog est la protéine membranaire Patched (Ptc) composée de douze segments transmembranaires et de deux grands segments extracellulaires nécessaires à la liaison du ligand Shh. Ptc forme un complexe avec la protéine Smoothened (Smo), une protéine à sept segments transmembranaires. D'autres protéines sont également impliquées dans cette voie de signalisation, il s'agit de la protéine costal-2 (Cos-2), de la sérine-thréonine kinase Fused (Fu), du suppresseur de celle-ci (SuFu) et des facteurs de transcription Gli-1/3 (homologues de la protéine Cubitus Interuptus (Ci) chez la drosophile) (Ho and Scott, 2002; Ogden et al., 2004). Dans le cytoplasme, ces protéines forment un complexe qui se lie aux microtubules. Quand la voie est inactive, c'est-à-dire lorsque Shh ne se fixe pas à Ptc, ce dernier est associé à Smo et en réprime

l'activité permettant ainsi à la protéine Gli-1/3 d'être clivée (Osterlund and Kogerman, 2006). Suite à ce clivage, le segment N-terminal libéré est transloqué dans le noyau où il agit comme répresseur transcriptionnel. Par contre, lorsque Shh se lie à son récepteur Ptc, Smo n'est plus inhibée et peut réprimer le clivage de la protéine Gli-1/3 qui subit alors une maturation lui permettant de devenir un activateur de la transcription (Figure 1.6).

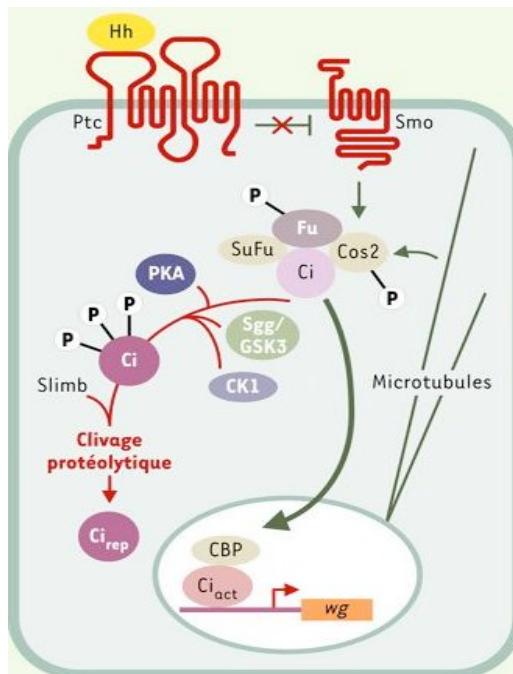


Figure 1.6. Représentation schématique de la voie de signalisation Hedgehog chez la drosophile. La fixation du ligand à son récepteur Patched empêche l'inhibition de Smoothened ce qui permet l'activation de Ci, sa translocation dans le noyau où il agira comme activateur de la transcription (Ci_{act}). En l'absence de Hedgehog, Smoothened reste inhibé, ce qui conduit au clivage partiel de Ci et à la formation du fragment N-terminal répresseur (Ci_{rep}). Figure adaptée de Navarro et Théron, 2002

2.2.3 La voie de signalisation Notch

La signalisation via les récepteurs membranaires Notch est une voie hautement conservée chez de multiples organismes et qui contrôle l'acquisition d'un destin cellulaire au cours du développement (Yoon and Gaiano, 2005; Chiba, 2006). L'activation de Notch, une protéine transmembranaire, dépend de son interaction avec un des ligands transmembranaires Delta, Jagged ou Serrate présent sur une cellule voisine (action juxtacrine) (Baker, 2000). Le récepteur subit alors deux clivages successifs : un premier clivage par une protéase appartenant à la famille des TACE/ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) au niveau de son domaine extracellulaire et un second clivage au sein du domaine transmembranaire réalisé par une γ -sécrétase (LaVoie and Selkoe, 2003). Le domaine intracellulaire ainsi libéré dans le cytoplasme peut alors migrer dans le noyau et se lier à différents facteurs de transcription de la famille des CSL pour former un complexe régulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement (Figure 1.7).

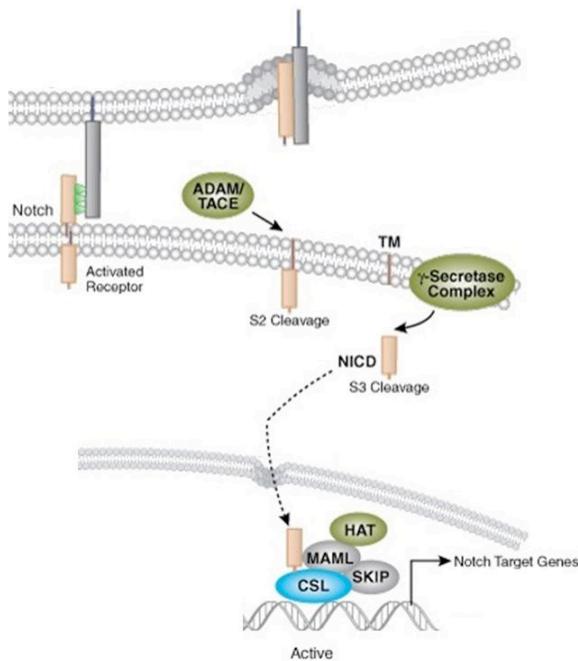


Figure 1.7. Représentation schématique du système de signalisation Delta-Notch. L’interaction du récepteur Notch avec son ligand induit un double clivage protéolytique extracellulaire et intramembranaire. Ce dernier entraîne la libération d’un fragment cytoplasmique du récepteur qui est transloqué dans le noyau et peut ainsi moduler l’expression de différents gène-cibles en s’associant avec des protéines de la famille CSL.
Figure adaptée : www.cellsignal.com/pathway/images/Notch

La voie de signalisation intracellulaire induite par l’interaction de Notch avec ses ligands conduit à l’inhibition de la différenciation des cellules progénitrices en induisant la répression de gènes proneuronaux. En effet, une cellule qui adopte un destin cellulaire précis transmettra l’information aux cellules voisines les empêchant d’entrer en différenciation. Ce mécanisme d’inhibition latérale permet donc de maintenir un pool de cellules non-différenciées (Tanigaki et al., 2001). Cependant, la voie Notch peut agir également de façon active en orientant spécifiquement vers un destin astroglial une cellule progénitrice (Lundkvist and Lendahl, 2001).

2.2.4 Voies de signalisation par les récepteurs aux cytokines

Les cytokines sont classées en quatre familles en fonction de leur structure et de leur mode de signalisation : les interleukines (IL-1/35), les interférons (IFN), les Tumor Necrosis Factor (TNF) et les TGF- β . On observe en effet l’existence de récepteurs spécifiques pour chacun de ces membres mais qui se comportent de manière semblable dans chacune de ces familles. Classiquement, on réserve le terme de « cytokine » aux facteurs de croissance qui jouent un rôle de messagers dans le système immunitaire. On sait cependant que ces facteurs sont également présents dans d’autres organes, y compris le système nerveux et par exemple, il a été démontré que les neurones étaient capables de synthétiser plusieurs cytokines comme l’IL-1 (Parnet et al., 1994), le TNF (Tchelingerian et al., 1995), le TGF- β (Slotkin et al., 1997) et l’IL-6 (Schobitz et al., 1994).

Certaines cytokines, en se fixant à leurs récepteurs peuvent stimuler une prolifération cellulaire et sont également capables d'induire ou de réprimer une différenciation cellulaire au cours du développement (Kitisin et al., 2007). Les récepteurs aux cytokines comportent classiquement une, deux, voire trois chaînes polypeptidiques α , β , γ glycosylées, comportant des domaines intracellulaires et extracellulaires de taille variables qui forment des homo ou des hétérodimères (Mellado et al., 2001 ;Grotzinger, 2002). Cependant, dans certains cas comme pour l'Interleukine-6 par exemple, une troisième sous-unité peut être associée. L'affinité d'une cytokine donnée pour un type de récepteur est fonction de l'association d'une, deux ou trois sous-unités. Dans le cas d'un dimère, on considère classiquement que l'une des sous-unités assure la liaison avec le ligand tandis que l'autre sous-unité permet la transduction du signal. Lors de la fixation d'une cytokine de la famille IL à son récepteur, des Janus kinase (JAK) associées au récepteur sont activées par transphosphorylation. Les résidus tyrosines phosphorylées des récepteurs permettent à leur tour ainsi la liaison de protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) par leur domaine SH2. Les protéines STAT sont à leur tour phosphorylées par les JAK, ce qui permet leur homodimérisation (Aaronson and Horvath, 2002). Celle-ci est requise pour permettre à ces facteurs de transcription de pénétrer dans le noyau pour y réguler l'expression de plusieurs gènes (Figure 1.8).

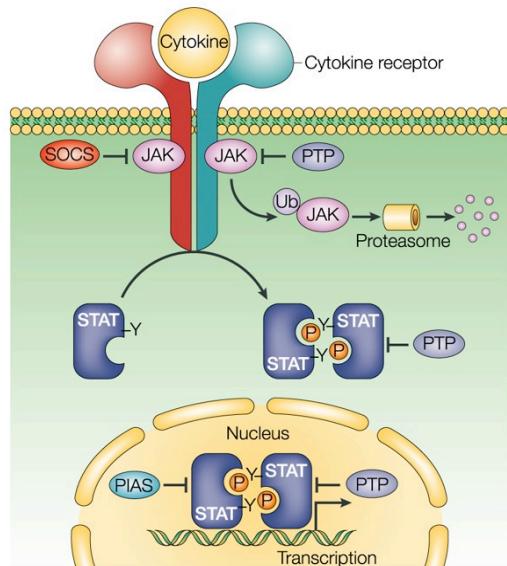


Figure 1.8. Représentation schématique de la voie activée par les cytokines de la famille IL. Lorsqu'une cytokine IL se fixe sur son récepteur, les protéines JAK sont phosphorylées. A son tour, elles phosphorylent le récepteur qui attire alors des protéines cytosoliques caractérisées par la présence d'un domaine SH2, les STAT. Les STAT interagissant avec le récepteur sont phosphorylées par les protéines JAK au niveau de résidus tyrosines et deviennent alors capables de se dimériser. C'est uniquement sous la forme de dimère que les STATs pénètrent dans le noyau pour y moduler la transcription. Figure adaptée de (Shuai and Liu, 2003).

2.2.5 Voies de signalisation par les récepteurs aux membres de la famille du TGF-β

Les ligands de la superfamille du Transforming Growth Factor-β (TGF-β) sont apparus comme des facteurs de croissance impliqués dans des processus importants du développement du système nerveux en inhibant ou en stimulant la prolifération selon le contexte cellulaire mais aussi en induisant ou en réprimant certains destins cellulaires (Schmitz and Chew, 2008; Bauer et al., 2009). C'est pourquoi il nous paraît important de détailler un peu plus les membres de cette superfamille et leur mode d'action.

On distingue une trentaine de protéines appartenant à cette superfamille formant deux groupes importants: les TGF-β proprement dits et les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Dans les deux groupes, les protéines sont d'abord synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs qui requièrent un clivage pour que la partie C-terminale soit biologiquement active, c'est-à-dire capable de se fixer au récepteur pour induire une réponse.

- **Les TGF-β** se fixent à des récepteurs de type sérine/thréonine kinase qui sont des tétramères formés de deux types de monomères : les récepteurs de type I et de type II (TGF β RI et TGF β RII). Les récepteurs de type II possèdent une activité sérine/thréonine kinase intrinsèque alors que les récepteurs de type I doivent être phosphorylés pour être actifs (Miyazono et al., 2000). Le TGF-β se fixe à T β RII, formant ainsi un complexe hétérodimérique qui peut alors recruter T β RI et l'activer par la phosphorylation de résidus serines et thréonines de son domaine GS. La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée par la phosphorylation de second messagers intracellulaires : les SMADs (Massague et al., 2005; Hill, 2009). Cette famille est divisée en trois groupes fonctionnels différents : les SMADs associés au récepteur ou R-SMAD, qui interagissent de façon spécifique directement avec le T β RI activé et sont spécifiques d'un ligand, les co-SMADs, médiateurs communs pour tous les membres de la famille du TGF-β, et les SMADs inhibiteurs ou I-SMAD (Wrana and Attisano, 2000) (Figure 1.9).

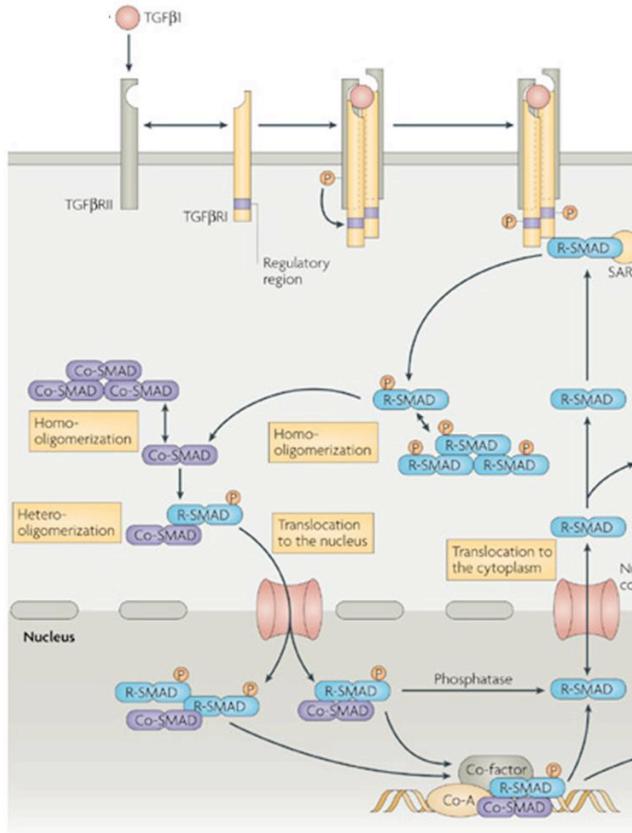


Figure 1.9. Représentation schématique de la signalisation par les TGF- β . La fixation de TGF- β sur son récepteur induit l'hétérotétramérisation de celui-ci. Après phosphorylation de résidus sérine et thréonine du T β RI par T β RII, on observe un recrutement des messagers secondaires R-SMAD. Ceux-ci sont phosphorylés par T β RII, peuvent alors interagir avec un co-SMAD. L'hétérodimère R-SMAD/Co-SMAD est transloqué vers le noyau pour agir comme activateur de la transcription de certains gènes. Figure adaptée de (Rubtsov and Rudensky, 2007).

- **Les Bone Morphogenetic Proteins (BMP)** jouent un rôle important dans le développement (Varga and Wrana, 2005). En effet, BMP4 est responsable de l'inhibition de la transformation des cellules ectodermiques en cellules neuroectodermiques. Selon certains modèles, la transformation des cellules ectodermiques en cellules neuroectodermiques se ferait par défaut (Chang and Hemmati-Brivanlou, 1998). Les BMPs empêcheraient donc le destin neuroectodermique de l'ectoderme (Moreau and Leclerc, 2004). Toutefois, au cours de la gastrulation, des substances telles que follistatine, chordin et noggin sécrétées par la notochorde inhibent localement l'activé de la BMP, permettant ainsi l'apparition de la plaque neurale (Weinstein and Hemmati-Brivanlou, 1999). Plus tard au cours du développement, BMP-2 et BMP-4 sécrétés par l'ectoderme induisent le « roof-plate » du tube neural et répriment l'apparition des motoneurones dans la partie dorsale du tube neural par exemple (Mizuseki et al., 2003).

Encore plus tard, ces mêmes facteurs interviennent à nouveau pour réguler la différenciation en astrocytes des cellules progénitrices de la zone sous-ventriculaire du télencéphale (Fukuda et al., 2004). Comme pour les TGF- β , il existe deux types de récepteurs à activité sérine/thréonine kinase : BMPR-I et BMPR-II. L'activation de ces récepteurs aboutit à la phosphorylation des facteurs de transcription SMADs qui seront alors transférés dans le noyau où ils moduleront l'expression de plusieurs gènes

2.2.6 Voies de signalisation par les récepteurs à activité tyrosine kinase

La signalisation médiée par les récepteurs tyrosine kinase (RTK) est l'une des voies principales qui existe chez l'ensemble des eucaryotes. Les voies de signalisation enclenchées par la fixation d'un ligand sur les RTK peuvent moduler la prolifération cellulaire mais aussi l'expression de gènes et ainsi, la différenciation cellulaire.

Les RTK sont des protéines transmembranaires composées d'un domaine extracellulaire porteur d'un site de liaison pour le ligand, d'un segment transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase. Les récepteurs sont présents dans la membrane sous forme de monomères. Lorsqu'un ligand se fixe à un RTK monomère, celui-ci recrute un autre monomère membranaire, se dimérisé et le domaine tyrosine kinase (SH1) de chaque monomère change de conformation et devient alors capable de phosphoryler des résidus tyrosine déterminés du domaine cytoplasmique de son partenaire, ce qui active ainsi une cascade de transduction du signal à l'intérieur de la cellule. La transphosphorylation des résidus tyrosines des RTK est déterminante pour le recrutement des protéines de signalisation. Ces protéines de signalisation possèdent des sites de liaison SH2 (Scr Homology domain 2) qui se lient spécifiquement à une séquence de 1 à 6 acides aminés situés en C-terminal de la phosphotyrosine ou des sites de liaison PTB (Phospho-Tyrosin Binding) qui reconnaissent une séquence de 3 à 5 acides aminés en N-terminal par rapport à la tyrosine phosphorylée (Pawson et al., 2002). Il existe également des protéines dites adaptatrices qui peuvent se lier sur les tyrosines phosphorylées. Celles-ci ne contiennent que des domaines SH2 ou SH3 (ces domaines reconnaissent des hélices polyprolines) comme la protéine Grb2 impliquée dans la voie de signalisation Ras/MAP-kinase. En fonction des résidus tyrosines phosphorylés et donc de la spécificité des protéines de signalisation qui interagissent avec les RTK, différentes voies de signalisation seront stimulées (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

- **La voie Ras/MAP-kinases**

Les protéines Ras appartiennent à la famille des protéines commutateurs monomériques de type GTPases. Rappelons que ce sont des protéines intracellulaires passant d'une forme active à une forme inactive et dont le rôle est en autre de transmettre les signaux de nombreux RTK à une cascade de sérine/thréonine kinases régissant la prolifération et la différenciation cellulaire (Sundaram, 2006). Ces protéines sont activées par Sos, un facteur d'échange de nucléotide à guanine. La protéine adaptatrice Grb2 s'associe avec Sos via son domaine de liaison SH3, le complexe Grb2-Sos peut être recruté par un RTK dont le site spécifique de la tyrosine phosphorylée est reconnu par le domaine SH2 de Grb2. La protéine Ras ancrée au feuillet membranaire interne par isoprénylation est activée par l'échange de GDP en GTP catalysé par Sos. Ras peut alors se lier au domaine N-terminal de Raf qui est une sérine/thréonine kinase (Li et al., 2001). Il s'en suit alors une cascade conduisant à la phosphorylation de Erk (Extracellular factor-Regulated Kinase), une MAP-kinase, qui sera alors transloquée dans le noyau où elle phosphorylera à son tour des facteurs de transcription tels que c-fos et c-jun (Figure 1.10).

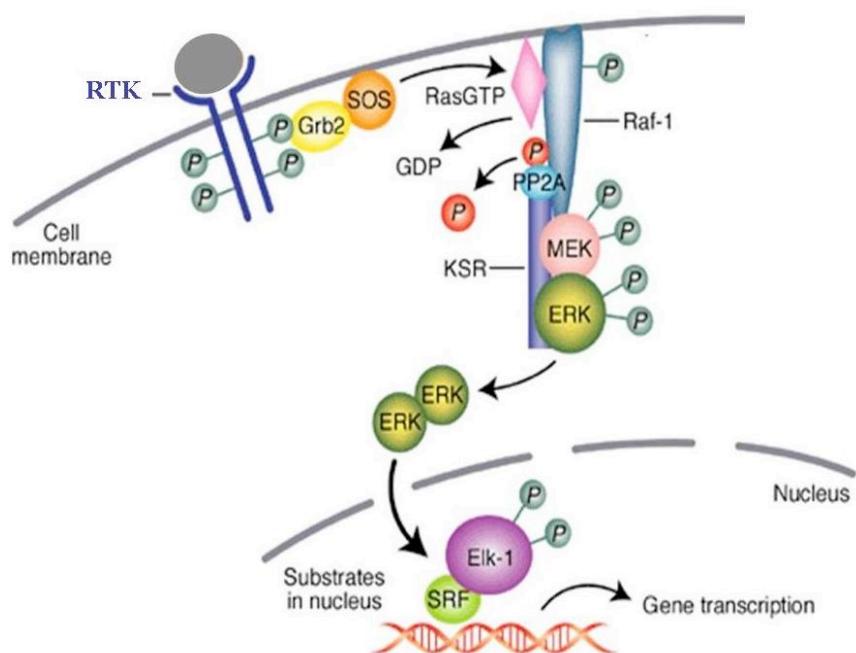


Figure 1.10. Représentation schématique de la voie Ras/MAP-kinases. Les récepteurs RTK activés par la fixation du ligand entraînent une cascade de phosphorylation conduisant à la phosphorylation de facteurs de transcription. Figure adaptée de (Kolch, 2002).

- **La voie Protéine kinase C (PKC)**

L'isoforme γ de la phospholipase C possède un domaine SH2 et est donc capable de reconnaître des phosphotyrosines de RTK. Une fois fixée aux récepteurs activés, la phospholipase C est localisée au voisinage du feuillet interne de la membrane plasmique, riche en phosphatidylinositol biphosphate (PIP2). L'hydrolyse de PIP2 par la phospholipase C produit deux composés importants : l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) (Heath et al., 2003). L'IP3 diffuse dans le cytoplasme et se fixe sur son récepteur, des canaux calciques ligand-dépendants présents sur la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui provoque la libération de calcium intracellulaire (Mikoshiba and Hattori, 2000) tandis que le DAG associé à la membrane attire une sérine/théronine kinase cytoplasmique, la protéine kinase C (PKC) (Toker, 1998). Cette dernière, en se fixant sur le DAG, change de conformation, ce qui active la kinase et lui permet de phosphoryler ses protéines-cibles dont la protéine Raf de la voie de signalisation Ras/MAP-kinases (Figure 1.11).

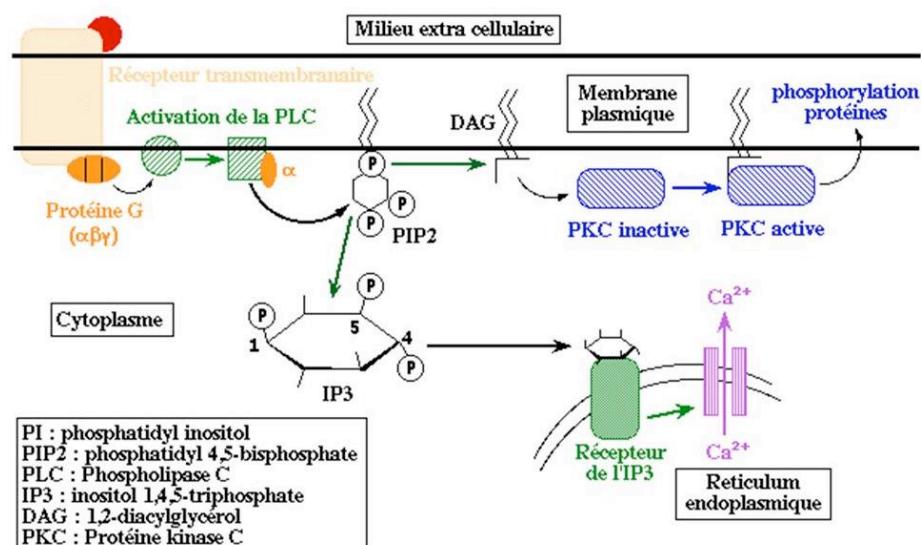


Figure 1.11. Représentation schématique de la voie PKC. L'activation de l'isoforme γ de la PLC conduit à la production d'IP3 et de DAG entraînant la libération de calcium. Le DAG pourra alors activer la PKC qui phosphorylera des protéines-cibles comme Raf activant alors la transduction du signal. Le calcium quant à lui est capable de déclencher diverses réponses via une interaction avec des protéines cibles comme par exemple la calmoduline. Figure adaptée de Jaspard 2006.

Cette voie de signalisation n'active pas uniquement la prolifération cellulaire (via la voie MAP-kinases) ; des expériences de transfection ont démontré le rôle que pouvait jouer la protéine kinase C sur la

différenciation, ce qui suggère que Raf n'est pas la seule protéine-cible de PKC (Mackay and Twelves, 2007).

- **La voie PI3-kinase (PI3K)**

La phosphoinositol-3-kinase (PI3K) est constituée de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice, P85 contenant deux domaines SH2 et une sous-unité catalytique, P110. L'association de PI3K aux tyrosines phosphorylées du récepteurs RTK induit une modification conformationnelle de la protéine qui peut alors phosphoryler le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) conduisant à la production de phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) indispensable à l'activation de la kinase Akt (Figure 1.12). Cette kinase active divers facteurs de transcription qui permettent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire.

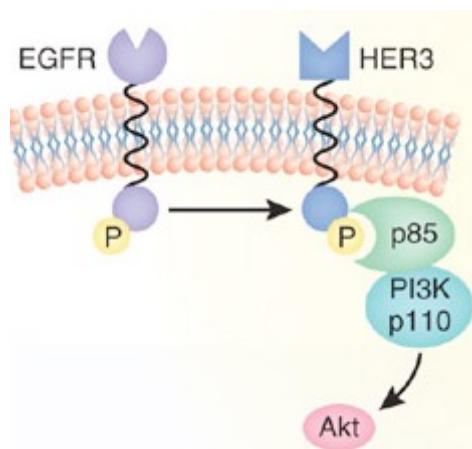


Figure 1.12. Représentation schématique simplifiée de la voie PI3K. La sous-unité régulatrice P85 de la PI3-kinase se lie à des résidus tyrosines phosphorylés du récepteur RTK via ses sites SH2. La sous-unité catalytique P110 active la protéine kinase Akt capable de réguler l'expression de facteurs de transcription agissant sur la prolifération ou la survie des cellules. Figure adaptée de (Arteaga, 2007).

2.3 Les récepteurs ErbB.

Parmi les récepteurs à activité tyrosine kinase RTK, les récepteurs ErbB jouent un rôle important durant le développement embryonnaire ainsi que durant l'âge adulte, en contrôlant la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Stern, 2003; Holbro et al., 2003; Birchmeier, 2009). Les récepteurs de la famille ErbB sont fortement exprimés dans le tissu épithélial, le tissu conjonctif et le tissu nerveux. Cette famille de récepteurs comprend quatre membres : EGFR (ErbB1/HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4) (Burgess, 2008). Chacun des ces récepteurs est composé d'un domaine extracellulaire responsable de la liaison au ligand, d'un

segment transmembranaire et d'une région intracellulaire siège de l'activité enzymatique tyrosine kinase (Roskoski, Jr., 2004).

La région extracellulaire est constituée de quatre domaines dénommés I, II, III et IV. En l'absence de ligand, les récepteurs EGFR, ErbB3 et ErbB4 adoptent une conformation fermée suite à des interactions intramoléculaires entre les domaines II et IV qui sont riches en cystéines. Lorsque le ligand se fixe, il en résulte un changement de conformation au niveau des domaines I et III permettant ainsi au domaine II d'exposer un site de dimérisation. La particularité du récepteur ErbB2 est d'être constamment en conformation « ouverte » ce qui à la fois empêche la fixation de tout ligand à ce récepteur mais également lui confère un potentiel de dimérisation supérieur aux autres membres de la famille (Figure 1.13). Quant à ErbB3, il présente également une particularité puisque qu'une mutation de son domaine cytoplasmique inactive ses propriétés enzymatiques. Pour induire une réponse cellulaire, ErbB3 doit donc nécessairement former un hétérodimère afin d'être trans-phosphorylé (Hynes and Lane, 2005; Berger et al., 2004).

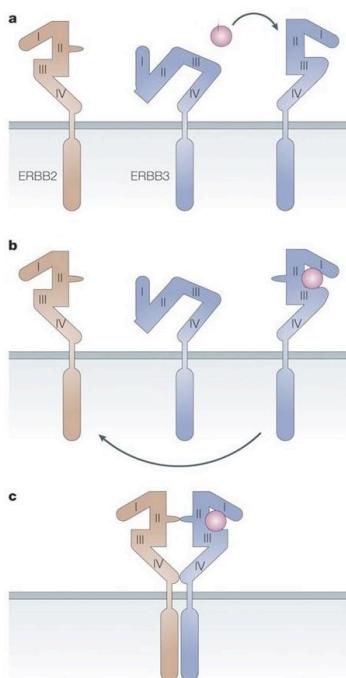


Figure 1.13. Structure de la partie extracellulaire des récepteurs ErbB. La région extracellulaire des récepteurs ErbB se compose de quatre domaines. En l'absence de ligand, les récepteurs (ErbB2 excepté) adoptent une conformation fermée régie par des interactions intramoléculaires entre les domaines. La liaison d'un ligand sur un récepteur ErbB permet à celui-ci d'exposer son domaine de dimérisation (conformation ouverte). Figure adaptée de Hynes and Lane, 2005.

La dimérisation des récepteurs ErbB active leur activité tyrosine kinase conduisant à leur phosphorylation au niveau de résidus tyrosine déterminés et qui dépendent de l'identité du ligand (Lemmon, 2009). En fonction des tyrosines phosphorylées, des protéines adaptatrices spécifiques sont alors recrutées recrutant préférentiellement l'une ou l'autre voie de signalisation comme la voie ras/MAP-kinase ou la voie PKC par

exemple. L'EGFR est également capable de phosphoryler directement des facteurs de transcription tels que STAT-1, -3 et -5 qui régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la survie cellulaire (Figure 1.14). Enfin, des travaux récents ont démontré que le domaine intracellulaire de récepteurs ErbB pouvait être clivé et transloqué dans le noyau pour agir comme facteur de transcription (Wells and Marti, 2002).

La durée d'activation représente également un paramètre important capable de moduler la nature des voies de signalisation qui seront engagées et *in fine*, quels seront les effets cellulaires produits. Plusieurs processus distincts permettent par ailleurs d'atténuer le signal transmis par les récepteurs ErbB. Ainsi, dans le cas de l'EGFR, l'internalisation dans des vésicules recouvertes de clathrines suivie de l'adressage des vésicules vers les lysosomes semble être le principal mécanisme d'arrêt de signalisation. L'internalisation et la dégradation consécutive dans les lysosomes sont contrôlées par le recrutement induit par le récepteur activé d'une ubiquitine ligase, la protéine Cbl. Le récepteur est alors ubiquitinylé puis dégradé (Sorkin and Goh, 2009).

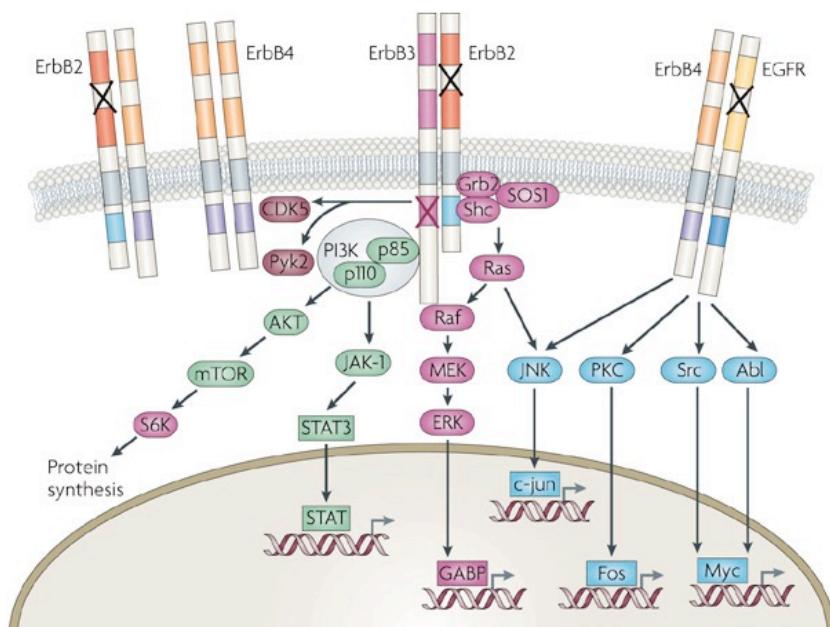


Figure 1.14. Représentation schématique des différentes voies activées par les récepteurs ErbB. L'activation des récepteurs ErbB est couplée avec l'activation des voies Ras/MAP-kinases, PLC γ -PKC, STAT et PI3K. Ces voies aboutissent à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération, la différenciation, la survie ou la migration cellulaire. Figure adaptée de (Mei and Xiong, 2008).

Les récepteurs ErbB jouent un rôle essentiel en contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire, tant au cours du développement embryonnaire qu'à l'âge adulte. L'importance des récepteurs ErbB est illustrée par la létalité embryonnaire ou

périnatale des souris dont les gènes *ErbB* ont été invalidés. Une mort rapide après la naissance est observée chez les souris déficientes en EGFR suite à des anomalies de plusieurs organes comme la peau, les poumons et certaines régions du système nerveux (Sibilia et al. 1998).

De même, des souris invalidées pour le gène *ErbB2* meurent à un stade embryonnaire précoce et démontrent que ce gène est important pour le bon développement du cœur, des muscles et des neurones moteurs (Leu et al., 2003). Des études réalisées sur des souris dont le gène *ErbB2* est invalidé de façon conditionnelle (permettant un développement embryonnaire plus tardif) ont démontré son rôle essentiel pour le développement du système nerveux périphérique (Garratt et al., 2003). Enfin, des souris mutantes pour ErbB4 montrent, en plus d'un développement anormal du cœur responsable d'une létalité à E10-E11, une mauvaise guidance axonale (Gassmann et al., 1995).

2.3.1 Les ligands des récepteurs ErbB

Il existe une vingtaine de ligands capables de se fixer aux récepteurs ErbB. Chacun de ces ligands possède un motif EGF-like (Epidermal Growth Factor). L'EGF est un polypeptide constitué de 53 acides aminés et caractérisé par la présence de six cystéines qui forment trois ponts intramoléculaires par liaisons disulfures déterminant une conformation tridimensionnelle importante pour son activité biologique. L'EGF est synthétisé sous la forme de précurseur inactif clivé par des protéases appartenant à la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) ou des MMP (Matrix Metalloprotease). D'autres facteurs de croissance ayant une structure globalement similaire à celle de l'EGF sont regroupés dans la même famille. Il s'agit du TGF α (Transforming Growth Factor α), de l'HB-EGF (Heparin-Binding EGF-like Growth Factor) (Higashiyama et al., 2008), de la Bétacelluline (BTC) (Dunbar and Goddard, 2000), de l'Amphiréguline (AR) (Willmarth and Ethier, 2006), de l'Epiréguline (EPR) (Jones et al., 2003) et des Neurégulines (Nrg 1-4). Ces facteurs de croissance ont chacun une affinité spécifique pour l'un des récepteurs ErbB hormis ErbB2 : EGF, TGF α et l'Amphiréguline se fixent et activent préférentiellement le récepteur EGFR ; les Neurégulines se lient à ErbB3 et ErbB4 alors que la Bétacelluline, l'Epiréguline et HB-EGF reconnaissent spécifiquement l'EGFR et ErbB4 (Figure 1.15).

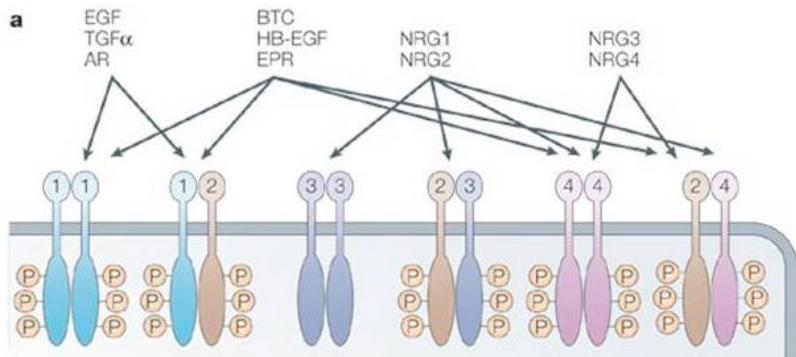


Figure 1.15. Reconnaissance spécifique ligand-récepteurs dans la famille ErbB. La famille ErbB est composée de quatre récepteurs qui se lient spécifiquement à un ou plusieurs ligands. L'EGF, l'Amphiréguline et le TGF α interagissent préférentiellement avec l'EGFR ; la Bétacelluline, l'Epiréguline et HB-EGF se fixent spécifiquement à EGFR ou ErbB4 ; enfin, les Neurégulines-1 et 2 s'associent avec ErbB3 ou ErbB4 tandis que les Neurégulines-3 et -4 reconnaissent ErbB4. Figure adaptée de Hynes and Lane, 2005.

Outre les Neurégulines que nous décrirons ci-dessous dans cette introduction, il a été démontré que l'EGF jouait un rôle capital durant la neurogenèse et ce durant le développement embryonnaire comme à l'âge adulte (Cameron and McKay, 1998; Gage, 2002). L'administration d'EGF exogène conduit à la production de cellules néoformées dans le striatum en induisant la migration de cellules de la zone sous-ventriculaire ou en stimulant localement certains progéniteurs cellulaires (Kempermann and Gage, 2000).

2.4 Les Neurégulines

Les Neurégulines (Nrg) constituent une famille de facteurs de croissance sécrétés ou transmembranaires. Toutes les isoformes protéiques sont caractérisées par la présence d'un motif EGF-like (Epidermal Growth Factor) au niveau du domaine extracellulaire qui est essentiel à leur activité biologique. En effet, c'est par l'intermédiaire de ce domaine que les Neurégulines peuvent activer leur récepteur ErbB (Pinkas-Kramarski et al., 1998) et induire notamment un signal de prolifération (Yarden and Sliwkowski, 2001). Ces facteurs de croissance sont principalement exprimés par les cellules nerveuses, tant neuronales que gliales, et en dehors du système nerveux par les cellules cardiaques et pulmonaires, où notamment leur rôle est critique à ce niveau durant le développement (Wen et al., 1994; Adlkofer and Lai, 2000).

2.4.1 Structure des Neurégulines.

Quatre gènes codant pour les Neurégulines ont été identifiés : *Nrg-1* (Britsch et al., 1998), *Nrg-2* (Carraway, III et al., 1997; Chang et al., 1997), *Nrg-3* (Hijazi et al., 1998) et *Nrg-4* (Harari et al., 1999) (Figure 1.16). *Nrg-1*, *Nrg-2*, *Nrg-3* sont impliqués

dans la prolifération, la différenciation, la maturation et la survie cellulaire tant dans le système nerveux central que dans le système nerveux périphérique (Esper et al., 2006).

Le gène *Nrg-1* fut le premier gène identifié codant pour les Neurégulines et donc le plus étudié jusqu'à présent. Au moins 30 isoformes protéiques codées par ce gène ont été identifiées (Tan et al., 2007). Cette diversité d'isoformes résulte d'un épissage alternatif (Steinthorsdottir et al., 2004) et de l'usage de promoteurs multiples (Falls, 2003). Découvertes indépendamment les unes des autres, ces isoformes ont été classées et nommées en fonction de leur activité biologique avant de réaliser que toutes ces protéines étaient codées par le même gène, par exemple : le « Glial Growth Factor » (GGF), l'« Acetylcholine Receptor Inducing Activity » (ARIA), le « Neu Differentiation Factor » (NDF) (Corfas et al., 1993; Falls et al., 1993; Marchionni et al., 1993; Corfas et al., 1995).

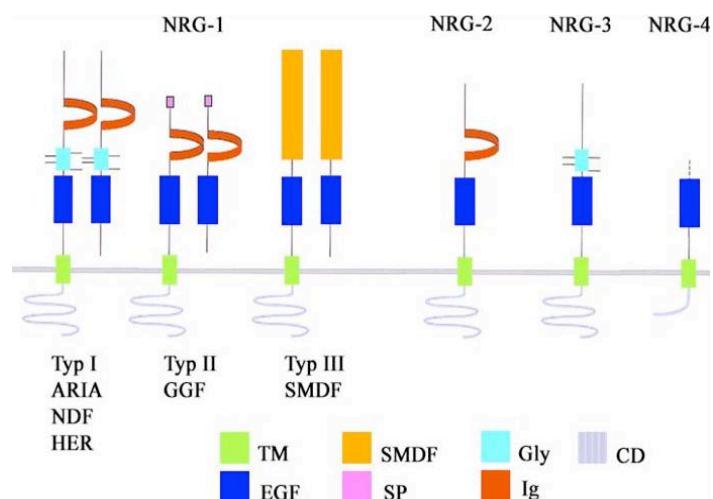


Figure 1.16. Structure générale et schématique des différentes isoformes de Neurégulines. Les différentes isoformes de Neurégulines possèdent un motif de type EGF au niveau de leur domaine extracellulaire ; la présence d'un segment transmembranaire permet de faire la différence entre les formes transmembranaires et les formes sécrétées

Les différentes isoformes de Nrg-1 sont classées dans six groupes en fonction de leur structure N-terminale : les Nrg-1 de type I sont caractérisées par un domaine immunoglobuline (Ig) accompagné d'un segment adjacent très glycosylé ; les types II contiennent également un domaine Ig ainsi qu'un domaine *kringle* ; les types III ou CRD-Nrg, contenant un domaine riche en cystéines (Cystein-Rich Domain) également référencées sous le nom SMDF (Sensory and Motor neuron Derived Factor) (Ho et al., 1995). Plus récemment, trois autres types de Nrg-1 ont été référencés (type IV à VI) (Figure 1.17). Toutes les isoformes comportent en outre :

- Un domaine de type EGF qui peut être de type α ou β en fonction de la séquence de 6 à 8 acides aminés présente entre le 5^{ème} et le 6^{ème} résidu cystéine de l'EGF domaine (Wen et al., 1992).
- Un domaine cytoplasmique de longueur variable (a, b ou c).

La plupart des isoformes sont synthétisées sous forme d'un précurseur transmembranaire dont le motif EGF est localisé du côté N-terminal extracellulaire. Dans le cas des Nrg-1 de type III, les extrémités N- et C-terminal sont dans le cytoplasme du fait de l'existence de deux domaines transmembranaires. Les formes sécrétées sont générées par un clivage au niveau de la région juxtamembranaire à partir de précurseurs transmembranaires. Ce clivage peut intervenir soit au niveau du réticulum endoplasmique (ces formes sont alors directement sécrétées) soit à la surface cellulaire (mécanisme de type « shedding »).

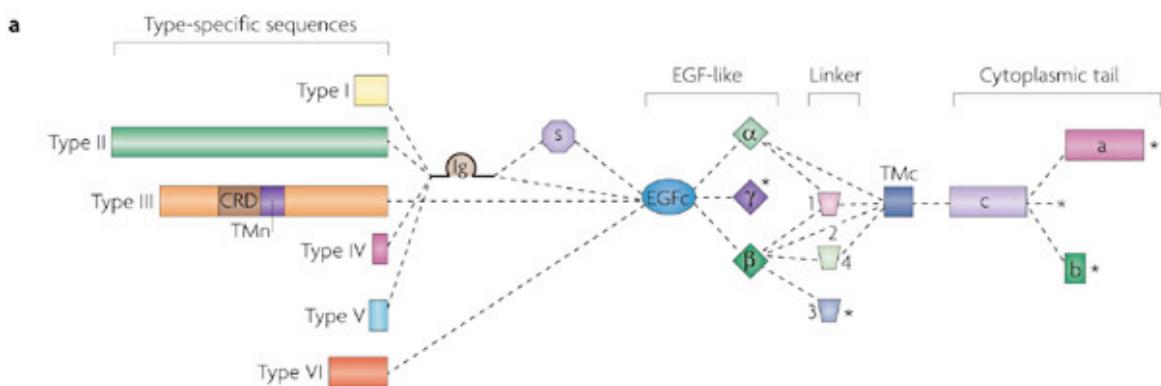


Figure 1.17. Structure des Neurégulines-1. Les différents types de Neurégulines-1 sont caractérisés par la présence d'un domaine extracellulaire contenant un motif de type EGF, qui en fonction de la recombinaison homologue, peut être de type α , β ou γ . Les formes transmembranaires contiennent également un domaine intracellulaire dont la longueur peut varier. Figure adaptée de Mei and Xhiong, 2008.

Les principales Neurégulines exprimées dans le système nerveux sont les CRD-Nrg ou Nrg-1 de type III qui se caractérisent par la présence de deux domaines transmembranaires. Ces isoformes peuvent subir plusieurs clivages : un premier clivage suite à l'action d'une ADAM (ADAM17 ou ADAM19) séparant le domaine extracellulaire du domaine intracellulaire. Le domaine extracellulaire peut être libéré de la membrane et diffuser dans le milieu juxtamembranaire suite à un second clivage (Figure 1.18). Enfin, le domaine intracellulaire peut également être clivé au niveau du segment transmembranaire par protéolyse intramembranaire régulée et dépendante de la présenilin (RIP, Regulated Intramembranous Proteolysis) (Landman and Kim, 2004).

Cette RIP est consécutive à l'activité de la γ -sécrétase, une protéase à composants multiples et liée à la membrane plasmique. Elle a la particularité de réaliser une hydrolyse des substrats au niveau de leur domaine transmembranaire (TDMs), c'est-à-dire en milieu hydrophobe. Il semble qu'il puisse s'agir ici d'un processus moléculaire de signalisation conservé par lequel les cellules transmettent un signal d'un compartiment cellulaire à un autre.

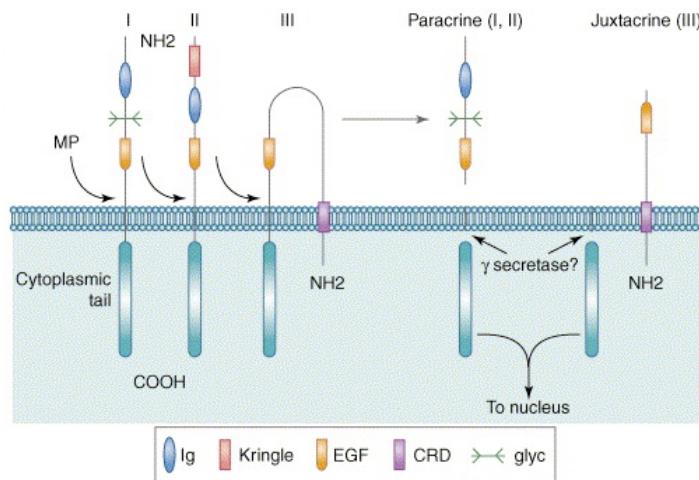


Figure 1.18. Représentation schématique du clavage des Neurégulines. Les CRD-Nrg sont caractérisées par la présence de deux domaines transmembranaires et un domaine riche en cystéines. Les domaines extra- et intracellulaire (cytoplasmic tail) peuvent être sujets à un clivage par une métalloprotéase (MP) et une γ sécrétase conduisant à leur libération de la membrane. Figure adaptée de Nave et Salzer, 2006.

2.4.2 Rôles des Neurégulines dans le système nerveux périphérique

Au niveau du système nerveux périphérique (SNP), les Nrg fonctionnent comme facteurs de différenciation produits par les neurones et favorisent ainsi la formation de cellules de Schwann à partir des cellules de la crête neurale. L'isoforme principalement exprimée est le GGF qui stimule à la fois l'acquisition du destin cellulaire, la prolifération, la survie et la différenciation des précurseurs en cellules de Schwann matures (Shah et al., 1994). Le phénotype des souris invalidées pour toutes les isoformes de Neurégulines, ou encore pour les récepteurs ErbB2 ou ErbB3 est caractérisé par une perte totale des cellules de Schwann, avec pour conséquence une disparition des neurones moteurs et sensitifs. En effet, l'absence de cellules de Schwann consécutive à l'invalidation des gènes codant pour les Neurégulines ou leurs récepteurs est suivie d'une mort neuronale résultant du manque de support trophique fourni par ces cellules de Schwann vis-à-vis des neurones périphériques (Michailov et al., 2004). Ce système de signalisation entre les neurones et les cellules de Schwann permet donc d'adapter finement le nombre de cellules de Schwann nécessaires au

nombre de neurones présents, ce qui constitue la garantie du niveau adéquat de myélinisation (Brinkmann et al., 2008; Chen et al., 2006; Garratt et al., 2000).

Toujours dans le système nerveux périphérique, les Nrg agissent également en tant que facteur qui augmente l'expression de certains gènes des myocytes, en particulier le gène codant pour les isoformes matures du récepteur à l'acétylcholine. Leur rôle est primordial dans la formation des jonctions neuromusculaires et c'est principalement la forme ARIA (Acetylcholine-Receptor Inducing Activity) qui intervient dans ce cas (Fischbach and Rosen, 1997; Yang et al., 1998) mais pas exclusivement. On a ainsi pu montrer que l'invalidation de l'isoforme CRD-Nrg chez la souris engendre une perte de coordination dans les interactions entre les neurones, la glie et les cibles postsynaptiques, interactions essentielles à la maturation synaptique (Wolpowitz et al., 2000; Yang et al., 1998).

2.4.3 Rôles des Neurégulines dans le système nerveux central (SNC)

Au niveau du SNC, le signal Nrg-1 est primordial pour la maturation et la mise en place de divers types cellulaires au cours du développement. Les cellules souches nerveuses (CSN) du SNC génèrent donc des progéniteurs restreints à une destinée neuronale (NRPs) et des progéniteurs de lignée gliale (GRPs), donnant respectivement naissance à des neurones et des cellules gliales différenciées.

2.4.3.1 Les neurones

Les NRPs sont mitotiquement actifs mais immatures au niveau électrique (Mayer-Proschel et al., 1997). Durant la neurogenèse, Nrg-1 agit comme mitogène spécifique pour ces cellules progénitrices de neurones, en induisant leur prolifération, et/ou en retardant leur différenciation en neurones matures, par activation de la voie de signalisation PLC/PKC. (Lai and Feng, 2004; Liu et al., 2005). Par la suite, une fois les neurones post-mitotiques produits, les Neurégulines favorisent leur migration le long des fibres gliales, de la surface ventriculaire à la surface piale du cortex en développement (Anton et al., 1996). En effet, une isoforme des Nrg-1, le GGF, est exprimé par les neurones corticaux en migration, permettant à la fois cette migration, mais favorisant également le maintien et l'elongation de ces fibres gliales (Anton et al., 1997; Zheng and Feng, 2006). Il en est de même pour la translocation des neurones granulaires le long des fibres de Bergmann lors l'ontogenèse du cervelet (Rio et al., 1997). Enfin, il a été démontré que les isoformes Nrg-1 β stimulent l'extension

neuritique et le développement de l'arborisation synaptique des neurones hippocampiques via une voie de signalisation impliquant la voie MAPK et PKC (Vaskovsky et al., 2000).

2.4.3.2 *Les astrocytes*

Les cellules gliales radiaires sont directement impliquées dans la mise en place et la maintenance du cortex cérébral. Les astrocytes contribuent peu ou pas à la neurogenèse mais en revanche, ils sont capables par la suite de moduler l'activité neuronale en contrôlant les vagues de signalisation calcique. Il a été démontré que les isoformes Nrg-1 jouent un rôle critique dans l'établissement des cellules gliales radiaires à partir du neuroépithélium, et dans leur transformation en astrocytes au cours du développement. On observe ainsi qu'une « down-régulation » des récepteurs ErbB2 à la surface des cellules gliales radiaires induit la transformation prématuée de ces dernières en astrocytes. A l'inverse, une « up-régulation » par les Nrg de ces mêmes récepteurs engendrera le phénomène inverse (Schmid et al., 2003). Cependant une fois les astrocytes différenciés, Nrg-1 et plus particulièrement l'isoforme NDF accélère spécifiquement leur maturation ainsi que leur survie en prévenant leur apoptose. A ce moment, ils deviennent alors capables d'établir entre eux des jonctions communicantes responsables de l'apparition des vagues calciques. Enfin, les astrocytes sont eux-mêmes capables de produire et sécréter de multiples isoformes des Nrgs (Pinkas-Kramarski et al., 1994; Raabe et al., 1998).

2.4.3.3 *Les oligodendrocytes*

La myélinisation dans le SNC des vertébrés est nécessaire pour observer une conduction rapide et efficace du potentiel d'action. Dans le SNC, les oligodendrocytes sont les cellules responsables de la synthèse et du maintien de cette gaine de myéline. A l'instar du rôle des Neurégulines dans le système nerveux périphérique et plus particulièrement dans le cas des cellules de Schwann, les Neurégulines dérivées des axones du SNC régulent de façon cruciale la survie et la maturation des oligodendrocytes ainsi que leur capacité de myélinisation (Lai and Feng, 2004). Dans diverses études, on a pu mettre en évidence un effet variable des Nrg-1 sur le développement des oligodendrocytes, en fonction du degré d'engagement des précurseurs vers une destinée oligodendrogliale (OP ou Oligodendrocytes Precursors) (Raabe et al., 2004). Nrg-1 agirait ainsi comme mitogène sur les précurseurs présents

au sein des neurosphères, favorisant leur croissance, et inhiberait ensuite la différenciation précoce des OPs en oligodendrocytes matures (Calaora et al., 2001). Plus tardivement au cours de la maturation des oligodendrocytes, l'implication du signal Nrg-1/ ErbB4 et la translocation nucléaire de la partie intracellulaire du récepteur (ErbB IntraCellular Domain ou EICD) favorise la maturation des oligodendrocytes et leur capacité de myélinisation (Sussman et al., 2005). Ce processus résulte notamment d'une augmentation stimulée par l'EICD de l'expression de la protéine basique de la myéline (MBP) indispensable à la compaction de la myéline immature. Enfin, les oligodendrocytes adultes expriment et sécrètent eux-mêmes différentes isoformes de Nrg et expriment les quatre sous-types de récepteurs ErbB. Il est donc logique de penser que les oligodendrocytes adultes jouent un rôle dans leur propre régulation et influencent le développement des cellules gliales qui les entourent (Deadwyler et al., 2000).

2.4.4 La signalisation bidirectionnelle de CRD-Nrg

Il semble que les Neurégulines transmembranaires puissent se comporter comme des molécules de signalisation bidirectionnelle, du moins dans les neurones : d'une part, elles sont à l'origine d'une signalisation « classique » ou « *forward signaling* » au niveau des cellules exprimant les récepteurs ErbB, suite à la mobilisation de ces récepteurs et le recrutement de protéines de signalisation et d'autre part, il a récemment été mis en évidence que le domaine intracellulaire de CRD-Nrg (ICD) pourrait être transloqué dans le noyau des neurones, ce qui favoriserait leur survie (« *back-signaling* ») (Liu et al., 1998; Bao et al., 2003).

- **Forward signaling**

Les voies de signalisation recrutées par les dimères de récepteurs ErbB formés à l'instigation des Nrgs ne sont pas simplement déterminées par les propriétés de signalisation individuelles de ses deux composants. En effet, les récepteurs ErbB peuvent acquérir des propriétés de signalisation spécifiques consécutivement au processus de transphosphorylation, ceci par l'apparition de diverses combinaisons de résidus tyrosines phosphorylés. L'identité des adaptateurs recrutés pour la transmission intracellulaire du signal dépend en effet de la nature de ces résidus phosphorylés, et plus particulièrement des 5 à 8 acides aminés les

entourant, recrutant ainsi spécifiquement une voie de transduction plutôt qu'une autre. Ces sites de phosphorylation des tyrosines sont généralement situés dans des régions non catalytiques et correspondent aux sites de liaison de protéines contenant des domaines SH2 ou PTB. Parmi celles-ci, on compte la présence de protéines adaptatrices (Shc, Crk, Grb2, Grb7), de kinases (Src, Chk, et la PI3K via sa sous-unité p85) et enfin de tyrosine phosphatases (SHP1 et 2) (Stover et al., 1995). Via le recrutement et l'action de ces différentes protéines, la voie Ras/MAP kinases, celle de la PLC γ /PKC et la voie PI3K/Akt peuvent être plus ou moins mobilisées afin d'activer plus ou moins divers facteurs transcriptionnels et induire ainsi plus ou moins l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différentiation, la motilité, la survie cellulaire.

- **Back signaling**

Suite à la liaison de Nrg-1 ECD au récepteur ErbB, et à la dimérisation de ce dernier, on observe à côté de ce « forward signaling » un clivage du domaine intracellulaire de Nrg-1. Ce phénomène de protéolyse intramembranaire est médié par la γ -sécrétase. On assiste à la libération d'un fragment ICD transloqué au sein du noyau de la cellule exprimant Nrg-1 (Bao et al., 2003). Celui-ci agit alors comme un transactivateur de la transcription, capable de réprimer l'expression de plusieurs régulateurs apoptotiques, dont BAK et RIP, induisant de ce fait une diminution de la mort neuronale *in vitro*. Des études ont ainsi pu démontrer que traiter des neurones exprimant CRD-Nrg avec des formes solubles de l'ECD ou domaine extracellulaire du récepteur ErbB induisait la survie neuronale et altérait l'expression de gènes apoptotiques tandis que l'inhibition concomitante de l'activité γ -sécrétase altérait ce processus, ce qui tend à prouver son implication dans le déroulement de ce « back-signaling » (Bao et al., 2003). Il faut enfin ajouter que la translocation ciblée de l'ICD dans le noyau nécessite la présence d'un motif NLS, qui a été identifié comme correspondant aux 8 premiers acides aminés faisant suite au domaine transmembranaire de Nrg-1.

2.4.5 Les Neurégulines-2

Bien que le gène *Nrg-2* soit relativement moins complexe, *Nrg-1* et *Nrg-2* possèdent un degré d'homologie relativement élevé et les isoformes codées par *Nrg-2* semblent avoir une organisation relativement similaire (Yamada et al., 2000; Falls, 2003). Comme dans toutes les Neurégulines dérivées de *Nrg-1*, le domaine EGF est hautement conservé et est suivi par une séquence hypervariable puis éventuellement par un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Tout comme les *Nrg-1* de type I et de type II, les *Nrg-2* contiennent un domaine immunoglobuline (Ig) du côté N-terminal et sont produites sous forme transmembranaire ou sécrétée. Etant donné la grande similitude entre *Nrg-1* et *Nrg-2*, il n'est pas étonnant que les isoformes issues de ce dernier soit également capables de se lier et d'activer les récepteurs ErbB3 et ErbB4 (Crovello et al., 1998; Nakano et al., 2000). Cependant, chacun de ces deux ligands induit une réponse distincte en fonction des sites du récepteur qui sont phosphorylés (Sweeney et al., 2001). De plus, l'expression de *Nrg-2* diffère de celle de *Nrg-1* ; en effet, par hybridation *in situ*, il a été démontré que les mRNA *Nrg-1* et *Nrg-2* sont exprimés dans des zones distinctes du cerveau (Longart et al., 2004). Il apparaît également que *Nrg-1* est prédominant dans certaines régions durant les périodes pré- et post-natale après lesquelles le niveau d'expression du mRNA diminue. Au contraire, *Nrg-2* est moins exprimé dans les cellules souches nerveuses chez l'embryon mais son expression augmente fortement durant la période post-natale. Ainsi, bien que fortement homologues, *Nrg-1* et *Nrg-2* présentent cependant des différences au niveau de leur expression suggérant que ces deux gènes pourraient avoir des effets qui leurs sont bien spécifiques.

2.4.6 Les Neurégulines dans les maladies neurologiques

La sclérose en plaques (SEP) est une pathologie chronique et inflammatoire du SNC, caractérisée par une démyélinisation multifocale et une perte axonale secondaire (Franklin, 2002). L'étiologie et la pathogénèse de cette maladie sont encore inconnues mais quelle que soit la cause initiale, il est logique de penser qu'une néo-oligodendroliogenèse favorisait la récupération fonctionnelle du malade, voire préviendrait la perte axonale secondaire. L'expression de *Nrg-1* au niveau des lésions actives de la SEP diminue, ce qui pourrait contribuer au faible degré de remyélinisation observé (Marchionni et al., 1999 ; Viehöver et al., 2001). Des études animales ont par ailleurs montré que l'injection systémique d'une isoforme *Nrg-1* à des souris porteuses

d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) (un modèle de démyélinisation autoimmune) tarde les symptômes, diminue la sévérité de la maladie, augmente le taux de remyélinisation au niveau des lésions, et réduit significativement le taux de rechute (Marchionni et al., 1999 ; Cannella et al., 1998).

La schizophrénie est une des pathologies psychiatriques les plus fréquentes. Elle se définit par un désordre psychologique important associant des signes positifs (troubles comportementaux, émotionnels avec une production délirante plus ou moins élaborée) et négatifs (altération cognitive). Elle présente une prépondérance familiale, suggérant une composante héréditaire (Cloninger, 2002). Ainsi, plusieurs études génomiques (linkage) ont identifié un certain nombre de gènes de susceptibilité pour cette maladie, dont *Nrg-1* (Stefansson et al., 2002). Dans le SNC, *Nrg-1* et les récepteurs ErbB régulent l'expression des récepteurs NMDA au glutamate (Ozaki et al., 1997 ; Gu et al., 2005) et c'est une hypothèse expliquant le rôle de *Nrg-1* dans la schizophrénie (Coyle et al., 2003) puisqu'on observe une diminution du nombre de certaines sous-unités de ces récepteurs (Akbarian et al., 1996). Or on a suggéré que la diminution ou une altération de la fonction de ces récepteurs pourrait être à l'origine de certains symptômes associés à la schizophrénie (Mohn et al., 1999 ; Woo et al., 2007 ; Lewis et al., 2006).

Lors de traumatismes de la moelle épinière ou de lésions cérébrales, des dommages additionnels à la lésion elle-même peuvent avoir lieu suite à la mise en place de la réponse inflammatoire et de la toxicité consécutive à une libération non régulée de glutamate. Ce phénomène communément appelé « mort neuronale secondaire » se déroule à distance dans le temps de la lésion initiale et pourrait donc faire l'objet d'une thérapeutique neuroprotectrice. Les méthodes de génomique fonctionnelle ont permis de mettre en évidence un grand nombre de changements géniques et protéiques dans la moelle épinière lésée, dont notamment une élévation de l'expression de *Nrg-1* et de ses récepteurs (Lindholm et al., 2002). Une augmentation similaire apparaît dans le cerveau suite à une lésion traumatique ou un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique (Tokita et al., 2001 ; Parker et al., 2002). Cette augmentation de l'expression de *Nrg-1* est interprétée comme un mécanisme endogène neuroprotecteur qui serait capable d'atténuer la réponse pro-inflammatoire et de retarder la mort neuronale (Xu et al., 2005 ; Guo et al., 2006).

Les neuropathies périphériques constituent un ensemble de pathologies souvent douloureuses qui affectent la myéline périphérique et/ou les axones qu'ils soient

myélinisés ou non. Elles résultent d'une grande variété de causes toxiques, infectieuses, métaboliques, génétiques et traumatiques (Winer et al., 1992 ; McCarron et al., 1999). Les études sur les cellules de Schwann au niveau de nerfs lésés démontrent une multitude de changements dans l'expression de leurs gènes, dont une augmentation de production de Nrg-1, BDNF, NGF et CNTF (Li et al., 1997). Ces augmentations induisent une prolifération de ces cellules de Schwann et favorisent la repousse axonale (Carroll et al., 1997). Une invalidation de ces processus naturels de réparation pourrait faciliter à l'apparition de neuropathies périphériques chroniques. Tant Nrg-1 que les facteurs neurotrophiques pourraient donc servir d'agents thérapeutiques dans ces pathologies périphériques, bien que l'obstacle majeur à cette approche repose ici sur la délivrance de ces facteurs au niveau de la lésion, sans effets secondaires à distance (Apfel et al., 2001 ; Dobrowsky et al., 2005 ; ter Laak et al., 2000 ; Oka et al., 2000).

Une épaisseur optimale de gaine de myéline permet une propagation efficace de l'influx nerveux au niveau des différents sous-types d'axones et de là, une intégration harmonieuse des afférences (nous pensons ici au mode de contrôle de l'entrée médullaire des influx douloureux périphériques par exemple), mais aussi des efférences. Cela requiert donc que la taille de l'axone puisse être évaluée par les cellules de Schwann myélinisantes afin qu'elles effectuent le nombre correct de tour de myéline. Il a été démontré que cette information sur la taille axonale est encodée, du moins en partie, par la quantité de Nrg-1 de type III présente à la surface axonale (Michailov et al., 2004 ; Taveggia et al., 2005), modulant ainsi la communication axone/cellule de Schwann. Les neuropathies démyélinisantes héréditaires du SNP, telle que la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT1), résultent d'une expression anormale de protéines de membrane de myéline (Suter et al., 2003 ; Meyer et al., 2006). Une interaction physique perturbée entre les axones et les cellules gliales (secondaire à cette expression anormale de protéines de myéline) pourrait altérer la signalisation Nrg-ErbB et contribuer à cette pathologie.

Conclusion

Comme nous venons de le rappeler, au cours du développement, les cellules souches nerveuses sont capables de se différencier en astrocytes, neurones et oligodendrocytes suite à l'action de facteurs extrinsèques et intrinsèques induisant l'activation de nombreuses voies de signalisation. Plusieurs observations ont démontré l'implication des Neurégulines dans divers de ces processus (prolifération, différenciation, migration, maturation, survie...). Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont démontré le rôle des Neurégulines dans la régulation de la survie et la prolifération des cellules souches nerveuses au cours du développement mais également ont suggéré leur implication dans le choix d'un destin cellulaire. Par ailleurs, d'autres auteurs ont démontré qu'à côté de leur signalisation classique via une interaction entre région extracellulaire des Neurégulines et les récepteurs ErbB, ces facteurs de croissance semblent capables d'une signalisation reverse par translocation du domaine intracellulaire dans le noyau (*back-signaling*).

Au cours de ce travail, nous avons cherché de préciser le rôle de cette famille de facteur de croissance dans le choix d'un destin cellulaire au cours du développement, tout en gardant à l'esprit leur éventuel potentiel dans le cadre d'une thérapie cellulaire chez l'adulte. Nous avons donc tenté de répondre aux questions suivantes : 1) est-il possible d'influencer le choix d'un destin cellulaire particulier dans les cellules souches nerveuses sous l'effet des Neurégulines ; 2) si oui, quel(s) serait (seraient) le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) éventuellement recrutable ou applicable en terme de régénération. Le chapitre II est consacré à l'étude des Neurégulines-1 et leurs effets sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses *in vitro*. Dans ce chapitre, nous décrivons un mécanisme moléculaire original responsable de la modulation de la différenciation par les Neurégulines-1 et qui établit un lien direct entre les influences intrinsèques et extrinsèques telles que nous les avons rappelées en préambule du point 2 de cette introduction (Edlund and Jessell, 1999). La plupart des résultats de ce chapitre font l'objet d'un article actuellement sous presse (appendice 2). Dans le chapitre III, nous décrivons les résultats préliminaires obtenus dans l'étude du rôle du rôle de *Nrg-2* dans ces mécanismes. C'est sur la base de la similitude structurelle et topologique des isoformes codées par les deux gènes que nous avons entrepris cette dernière partie de notre travail.

Références bibliographiques

- Aaronson DS, Horvath CM** (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653-1655.
- Abeliovich A, Hammond R** (2007) Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev Biol* 304:447-454.
- Adlikofer K, Lai C** (2000) Role of neuregulins in glial cell development. *Glia* 29:104-111.
- Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, et al.** (1996) Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *The journal of neuroscience* 16:19-30.
- Andrews BF** (2002) Use of stem cells. *J Ky Med Assoc* 100:297.
- Anton ES, Cameron RS, Rakic P** (1996) Role of neuron-glial junctional domain proteins in the maintenance and termination of neuronal migration across the embryonic cerebral wall. *J Neurosci* 16:2283-2293.
- Anton ES, Marchionni MA, Lee KF, Rakic P** (1997) Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* 124:3501-3510.
- Apfel SC.** (2001). Neurotrophic factor therapy--prospects and problems. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 39:351-5.
- Arteaga CL** (2007) HER3 and mutant EGFR meet MET. *Nat Med* 13:675-677.
- Baker NE** (2000) Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle. *Bioessays* 22:264-273.
- Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA** (2003) Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 161:1133-1141.
- Barres BA, Raff MC** (1999) Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* 147:1123-1128.
- Bauer S, Adrian N, Siebenborn U, Fadle N, Plesko M, Fischer E, Wuest T, Stenner F, Mertens JC, Knuth A, Ritter G, Old LJ, Renner C** (2009) Sequential cancer immunotherapy: targeted activity of dimeric TNF and IL-8. *Cancer Immun* 9:2.
- Berger MB, Mendrola JM, Lemmon MA** (2004) ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett* 569:332-336.
- Bienz M, Clevers H** (2003) Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus--proof beyond a reasonable doubt? *Nat Cell Biol* 5:179-182.
- Birchmeier C** (2009) ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp Cell Res* 315:611-618.
- Blum B, Benvenisty N** (2008) The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res* 100:133-158.
- Blume-Jensen P, Hunter T** (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365.
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Muller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave KA** (2008) Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59:581-595.
- Briscoe J, Ericson J** (1999) The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol* 10:353-362.
- Britsch S, Li L, Kirchhoff S, Theuring F, Brinkmann V, Birchmeier C, Riethmacher D** (1998) The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* 12:1825-1836.
- Burgess AW** (2008) EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors* 26:263-274.

- Calaora V, Rogister B, Bismuth K, Murray K, Brandt H, Leprince P, Marchionni M, Dubois-Dalcq M** (2001) Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro. *J Neurosci* 21:4740-4751.
- Cameron HA, McKay R** (1998) Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 8:677-680.
- Cannella B, Hoban CJ, Gao YL, Garcia-Arenas R, Lawson D, et al.** (1998). The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10100-5
- Carraway KL, III, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, Lai C** (1997) Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387:512-516.
- Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA.** (1997). Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *The journal of neuroscience* 17:1642-59.
- Chang C, Hemmati-Brivanlou A** (1998) Cell fate determination in embryonic ectoderm. *J Neurobiol* 36:128-151.
- Chang H, Riese DJ, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ** (1997) Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387:509-512.
- Chen S, Velardez MO, Warot X, Yu ZX, Miller SJ, Cros D, Corfas G** (2006) Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci* 26:3079-3086.
- Chiba S** (2006) Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* 24:2437-2447.
- Choudhary P, Varga-Weisz P** (2007) ATP-dependent chromatin remodelling: action and reaction. *Subcell Biochem* 41:29-43.
- Clarke DL** (2003) Neural stem cells. *Bone Marrow Transplant* 32 Suppl 1:S13-S17.
- Cloninger CR.** (2002). The discovery of susceptibility genes for mental disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:13365-7.
- Corfas G, Falls DL, Fischbach GD** (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, also induces tyrosine phosphorylation of a 185-kDa muscle transmembrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1624-1628.
- Corfas G, Rosen KM, Aratake H, Krauss R, Fischbach GD** (1995) Differential expression of ARIA isoforms in the rat brain. *Neuron* 14:103-115.
- Coyle JT, Tsai G, Goff D.** (2003). Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003:318-27.
- Crovello CS, Lai C, Cantley LC, Carraway KL, III** (1998) Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2. *J Biol Chem* 273:26954-26961.
- Deadwyler GD, Pouly S, Antel JP, DeVries GH** (2000) Neuregulins and erbB receptor expression in adult human oligodendrocytes. *Glia* 32:304-312.
- Dobrowsky RT, Rouen S, Yu C.** (2005). Altered neurotrophism in diabetic neuropathy: spelunking the caves of peripheral nerve. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 313:485-91.
- Dunbar AJ, Goddard C** (2000) Structure-function and biological role of betacellulin. *Int J Biochem Cell Biol* 32:805-815.
- Edlund T, Jessell TM** (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96:211-224.
- Ehrenhofer-Murray AE** (2004) Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem* 271:2335-2349.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH** (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.

- Esper RM, Pankonin MS, Loeb JA** (2006) Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res Rev* 51:161-175.
- Falls DL** (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284:14-30.
- Falls DL, Rosen KM, Corfas G, Lane WS, Fischbach GD** (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72:801-815.
- Felling RJ, Levison SW** (2003) Enhanced neurogenesis following stroke. *J Neurosci Res* 73:277-283.
- Fischbach GD, Rosen KM** (1997) ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Annu Rev Neurosci* 20:429-458.
- Franklin RJM.** (2002). Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nature reviews. Neuroscience* 3:705-14.
- Fukuda S, Kondo T, Takebayashi H, Taga T** (2004) Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway. *Cell Death Differ* 11:196-202.
- Gage FH** (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22:612-613.
- Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C** (2000) Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* 22:987-996.
- Garratt AN, Ozcelik C, Birchmeier C** (2003) ErbB2 pathway in heart and neural diseases. *Trends Cardiovasc Med* 13:80-86
- Gassman M, Casagranda F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein K, Lemke G** (1995) Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378:390-394
- Grinnemo KH, Genead R, Kumagai-Braesch M, Andersson A, Danielsson C, Mansson-Broberg A, Dellgren G, Stromberg AM, Ekberg H, Hovatta O, Sylven C, Corbascio M** (2008) Costimulation blockade induces tolerance to HESC transplanted to the testis and induces regulatory T-cells to HESC transplanted into the heart. *Stem Cells* 26:1850-1857.
- Grotzinger J** (2002) Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochim Biophys Acta* 1592:215-223.
- Gu Z, Jiang Q, Fu AKY, Ip NY, Yan Z.** (2005). Regulation of NMDA receptors by neuregulin signaling in prefrontal cortex. *The journal of neuroscience* 25:4974-84.
- Guo W-P, Wang J, Li R-X, Peng Y-W.** (2006). Neuroprotective effects of neuregulin-1 in rat models of focal cerebral ischemia. *Brain Research* 1087:180-5.
- Harari D, Tzahar E, Romano J, Shelly M, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y** (1999) Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18:2681-2689.
- He X** (2003) A Wnt-Wnt situation. *Dev Cell* 4:791-797.
- Heath CM, Stahl PD, Barbieri MA** (2003) Lipid kinases play crucial and multiple roles in membrane trafficking and signaling. *Histol Histopathol* 18:989-998.
- Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N** (2008) Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci* 99:214-220.
- Hijazi MM, Young PE, Dougherty MK, Bressette DS, Cao TT, Pierce JH, Wong LM, Alimandi M, King CR** (1998) NRG-3 in human breast cancers: activation of multiple erbB family proteins. *Int J Oncol* 13:1061-1067.
- Hill CS** (2009) Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res* 19:36-46.
- Ho KS, Scott MP** (2002) Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 12:57-63.
- Ho WH, Armanini MP, Nuijens A, Phillips HS, Osheroff PL** (1995) Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J Biol Chem* 270:14523-14532.
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE** (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284:99-110.

- Huelsken J, Behrens J** (2002) The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115:3977-3978.
- Hynes NE, Lane HA** (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5:341-354.
- Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD** (1996) Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10:3129-3140.
- Jones FE, Golding JP, Gassmann M** (2003) ErbB4 signaling during breast and neural development: novel genetic models reveal unique ErbB4 activities. *Cell Cycle* 2:555-559.
- Kalani MY, Cheshier SH, Cord BJ, Bababeygy SR, Vogel H, Weissman IL, Palmer TD, Nusse R** (2008) Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16970-16975.
- Kempermann G, Gage FH** (2000) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp* 231:220-235.
- Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, Tang Y, Shetty K, Mishra B, Mishra L** (2007) Tgf-Beta signaling in development. *Sci STKE* 2007.
- Kokaia Z, Thored P, Arvidsson A, Lindvall O** (2006) Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i162-i167.
- Kolch W** (2002) Ras/Raf signalling and emerging pharmacotherapeutic targets. *Expert Opin Pharmacother* 3:709-718.
- Kwon CS, Wagner D** (2007) Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time. *Trends Genet* 23:403-412.
- Lai C, Feng L** (2004a) Neuregulin induces proliferation of neural progenitor cells via PLC/PKC pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 319:603-611.
- Lai C, Feng L** (2004b) Implication of gamma-secretase in neuregulin-induced maturation of oligodendrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 314:535-542.
- Landman N, Kim TW** (2004) Got RIP? Presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:337-351.
- LaVoie MJ, Selkoe DJ** (2003) The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem* 278:34427-34437.
- Lemmon MA** (2009) Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res* 315:638-648.
- Leu M, Bellmunt E, Schwander M, Farinas I, Brenner HR, Muller U** (2003) ErbB2 regulates neuromuscular synapse formation and is essential for muscle spindle development. *Development* 130:2291-2301.
- Lewis DA, Moghaddam B.** (2006). Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations. *Archives of neurology* 63:1372-6.
- Li H, Terenghi G, Hall SM.** (1997). Effects of delayed re-innervation on the expression of c-erbB receptors by chronically denervated rat Schwann cells in vivo. *Glia* 20:333-47.
- Li W, Chong H, Guan KL** (2001) Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation. *J Biol Chem* 276:34728-34737.
- Lindholm T, Cullheim S, Deckner M, Carlstedt T, Risling M.** (2002). Expression of neuregulin and ErbB3 and ErbB4 after a traumatic lesion in the ventral funiculus of the spinal cord and in the intact primary olfactory system. *Experimental brain research* 142:81-90.
- Liu X, Hwang H, Cao L, Wen D, Liu N, Graham RM, Zhou M** (1998) Release of the neuregulin functional polypeptide requires its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 273:34335-34340.
- Liu Y, Ford BD, Mann MA, Fischbach GD** (2005) Neuregulin-1 increases the proliferation of neuronal progenitors from embryonic neural stem cells. *Dev Biol* 283:437-445.
- Lois C, varez-Buylla A** (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074-2077.

- Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A** (2004) Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 472:156-172.
- Lundkvist J, Lendahl U** (2001) Notch and the birth of glial cells. *Trends Neurosci* 24:492-494.
- Lupo G, Harris WA, Lewis KE** (2006) Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:103-114.
- Macas J, Nern C, Plate KH, Momma S** (2006) Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci* 26:13114-13119.
- Mackay HJ, Twelves CJ** (2007) Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer* 7:554-562.
- Mahmoudi T, Verrijzer CP** (2001) Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene* 20:3055-3066.
- Marchionni MA, Goodearl AD, Chen MS, Bermingham-McDonogh O, Kirk C, Hendricks M, Danehy F, Misumi D, Sudhalter J, Kobayashi K, .** (1993) Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362:312-318.
- Marchionni MA, Cannella B, Hoban C, Gao YL, Garcia-Arenas R, et al.** (1999). Neuregulin in neuron/glial interactions in the central nervous system. GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocyte progenitor expansion, and enhances remyelination. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 468:283-95.
- Marti E, Bovolenta P** (2002) Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 25:89-96.
- Massague J, Seoane J, Wotton D** (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev* 19:2783-2810.
- Mayer-Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T, Rao MS** (1997) Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* 19:773-785.
- McCarron MO, Russell AJ, Metcalfe RA, Deysilva R.** (1999). Chronic vitamin E deficiency causing spinocerebellar degeneration, peripheral neuropathy, and centro-cecal scotomata. *Nutrition* 15:217-9.
- Mei L, Xiong WC** (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9:437-452.
- Mellado M, Vila-Coro AJ, Martinez C, Rodriguez-Frade JM** (2001) Receptor dimerization: a key step in chemokine signaling. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 47:575-582.
- Meyer zu Hörste G, Prukop T, Nave K-A, Sereda MW.** (2006). Myelin disorders: Causes and perspectives of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Journal of molecular neuroscience* 28:77-88.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA** (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.
- Mikoshiba K, Hattori M** (2000) IP3 receptor-operated calcium entry. *Sci STKE* 2000:E1.
- Miller JR, Rowning BA, Larabell CA, Yang-Snyder JA, Bates RL, Moon RT** (1999) Establishment of the dorsal-ventral axis in Xenopus embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J Cell Biol* 146:427-437.
- Miller RH** (2006) The promise of stem cells for neural repair. *Brain Res* 1091:258-264.
- Minger SL, Ekonomou A, Carta EM, Chinoy A, Perry RH, Ballard CG** (2007) Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med* 2:69-74.
- Miyazono K, ten DP, Heldin CH** (2000) TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75:115-157.
- Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, Muguruma K, Ikeya M, Nishiyama A, Arakawa A, Suemori H, Nakatsuji N, Kawasaki H, Murakami F, Sasai Y** (2003) Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5828-5833.
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH.** (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98:427-36.

- Mohrmann L, Verrijzer CP** (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* 1681:59-73.
- Montecino M, Stein JL, Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Cruzat F, Gutierrez S, Olate J, Marcellini S, Gutierrez JL** (2007) Nucleosome organization and targeting of SWI/SNF chromatin-remodeling complexes: contributions of the DNA sequence. *Biochem Cell Biol* 85:419-425.
- Moreau M, Leclerc C** (2004) The choice between epidermal and neural fate: a matter of calcium. *Int J Dev Biol* 48:75-84.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der KD** (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
- Nakano N, Higashiyama S, Kajihara K, Endo T, Ishiguro H, Yamada K, Nagatsu T, Taniguchi N** (2000) NTAKalpha and beta isoforms stimulate breast tumor cell growth by means of different receptor combinations. *J Biochem* 127:925-930.
- Nave KA, Salzer JL** (2006) Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol*. 16(5):492-500.
- Nelson WJ, Nusse R** (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483-1487.
- Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, ten BD, Kalani Y** (2008) Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:59-66.
- Ogden SK, Ascano M, Jr., Stegman MA, Robbins DJ** (2004) Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. *Biochem Pharmacol* 67:805-814.
- Oka N, Kawasaki T, Matsui M, Tachibana H, Sugita M, Akiguchi I.** (2000). Neuregulin is associated with nerve regeneration in axonal neuropathies. *Neuroreport* 11:3673-6.
- Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR** (2002) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem* 71:755-781.
- Osterlund T, Kogerman P** (2006) Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli. *Trends Cell Biol* 16:176-180.
- Ozaki M, Sasner M, Yano R, Lu HS, Buonanno A.** (1997). Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature* 390:691-4.
- Parker MW, Chen Y, Hallenbeck JM, Ford BD.** (2002). Neuregulin expression after focal stroke in the rat. *Neuroscience Letters* 334:169-72.
- Parnet P, Amindari S, Wu C, Brunke-Reese D, Goujon E, Weyhenmeyer JA, Dantzer R, Kelley KW** (1994) Expression of type I and type II interleukin-1 receptors in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 27:63-70.
- Patten I, Placzek M** (2000) The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci* 57:1695-1708.
- Pawson T, Raina M, Nash P** (2002) Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett* 513:2-10.
- Perrone-Capano C, di PU** (1996) Epigenetic factors and midbrain dopaminergic neurone development. *Bioessays* 18:817-824.
- Pinkas-Kramarski R, Eilam R, Spiegler O, Lavi S, Liu N, Chang D, Wen D, Schwartz M, Yarden Y** (1994) Brain neurons and glial cells express Neu differentiation factor/hergulin: a survival factor for astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9387-9391.
- Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Guarino BC, Wang LM, Lyass L, Alroy I, Alimandi M, Kuo A, Moyer JD, Lavi S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Seger R, Bacus SS, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y** (1998) ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol Cell Biol* 18:6090-6101.
- Przyborski SA** (2005) Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* 23:1242-1250.

- Raabe TD, Deadwyler G, Varga JW, DeVries GH** (2004) Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia* 45:197-207.
- Raabe TD, Francis A, DeVries GH** (1998) Neuregulins in glial cells. *Neurochem Res* 23:311-318.
- Raff MC, Durand B, Gao FB** (1998) Cell number control and timing in animal development: the oligodendrocyte cell lineage. *Int J Dev Biol* 42:263-267.
- Rando OJ, Zhao K, Crabtree GR** (2000) Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol* 10:92-97.
- Ringrose L, Paro R** (2004) Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 38:413-443.
- Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G** (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19:39-50.
- Roskoski R, Jr.** (2004) The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1-11.
- Rubtsov YP, Rudensky AY** (2007) TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* 7:443-453.
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR** (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:437-447.
- Sato M, Nakano T** (2001) Embryonic stem cell. *Intern Med* 40:195-200.
- Schmid RS, McGrath B, Berechid BE, Boyles B, Marchionni M, Sestan N, Anton ES** (2003) Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4251-4256.
- Schmitz T, Chew LJ** (2008) Cytokines and myelination in the central nervous system. *ScientificWorldJournal* 8:1119-1147.
- Schobitz B, De Kloet ER, Holsboer F** (1994) Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. *Prog Neurobiol* 44:397-432.
- Shah NM, Marchionni MA, Isaacs I, Stroobant P, Anderson DJ** (1994) Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 77:349-360.
- Shuai K, Liu B** (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3:900-911.
- Sibilia M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF** (1998) A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J* 17:719-731.
- Simone C** (2006) SWI/SNF: the crossroads where extracellular signaling pathways meet chromatin. *J Cell Physiol* 207:309-314.
- Slotkin TA, Wang XF, Symonds HS, Seidler FJ** (1997) Expression of mRNAs coding for the transforming growth factor-beta receptors in brain regions of euthyroid and hypothyroid neonatal rats and in adult brain. *Brain Res Dev Brain Res* 99:61-65.
- Sorkin A, Goh LK** (2009) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* 315:683-696.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, et al.** (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American journal of human genetics* 71:877-92.
- Steinthorsdottir V, Stefansson H, Ghosh S, Birgisdottir B, Bjornsdottir S, Fasquel AC, Olafsson O, Stefansson K, Gulcher JR** (2004) Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene* 342:97-105.
- Stern DF** (2003) ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res* 284:89-98.
- Stover DR, Becker M, Liebetanz J, Lydon NB** (1995) Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. *J Biol Chem* 270:15591-15597.
- Sundaram MV** (2006) RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook* 1-19.

- Sussman CR, Vartanian T, Miller RH** (2005) The ErbB4 neuregulin receptor mediates suppression of oligodendrocyte maturation. *J Neurosci* 25:5757-5762.
- Suter U, Scherer SS.** (2003). Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nature reviews. Neuroscience* 4:714-26.
- Sweeney C, Fambrough D, Huard C, Diamanti AJ, Lander ES, Cantley LC, Carraway KL, III** (2001) Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J Biol Chem* 276:22685-22698.
- Sylvester KG, Longaker MT** (2004) Stem cells: review and update. *Arch Surg* 139:93-99.
- Tan W, Wang Y, Gold B, Chen J, Dean M, Harrison PJ, Weinberger DR, Law AJ** (2007) Molecular cloning of a brain-specific, developmentally regulated neuregulin 1 (NRG1) isoform and identification of a functional promoter variant associated with schizophrenia. *J Biol Chem* 282:24343-24351.
- Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, Cho N, Onodera M, Mizuno Y, Urabe T** (2004) Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector. *Stroke* 35:1454-1459.
- Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T** (2001) Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 29:45-55.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, et al.** (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681-94.
- Tchelingerian JL, Monge M, Le SF, Zalec B, Jacque C** (1995) Differential oligodendroglial expression of the tumor necrosis factor receptors in vivo and in vitro. *J Neurochem* 65:2377-2380.
- ter Laak MP, Hamers FP, Kirk CJ, Gispen WH.** (2000). rhGGF2 protects against cisplatin-induced neuropathy in the rat. *Journal of neuroscience research* 60:237-44.
- Toker A** (1998) Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* 3:D1134-D1147.
- Tokita Y, Keino H, Matsui F, Aono S, Ishiguro H, et al.** (2001). Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes. *The journal of neuroscience* 21:1257-64.
- Trotter KW, Archer TK** (2007) Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:162-167.
- Van PH, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH** (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Varga AC, Wrana JL** (2005) The disparate role of BMP in stem cell biology. *Oncogene* 24:5713-5721.
- Vaskovsky A, Lupowitz Z, Erlich S, Pinkas-Kramarski R** (2000) ErbB-4 activation promotes neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurochem* 74:979-987.
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT** (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5:367-377.
- Viehöver A, Miller RH, Park SK, Fischbach G, Vartanian T.** (2001). Neuregulin: an oligodendrocyte growth factor absent in active multiple sclerosis lesions. *Developmental Neuroscience* 23:377-86.
- Wallen A, Perlmann T** (2003) Transcriptional control of dopamine neuron development. *Ann N Y Acad Sci* 991:48-60.
- Weinstein DC, Hemmati-Brivanlou A** (1999) Neural induction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:411-433.
- Wells A, Marti U** (2002) Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:697-702.
- Wen D, Peles E, Cupples R, Suggs SV, Bacus SS, Luo Y, Trail G, Hu S, Silbiger SM, Levy RB, .** (1992) Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 69:559-572.
- Wen D, Suggs SV, Karunagaran D, Liu N, Cupples RL, Luo Y, Janssen AM, Ben-Baruch N, Trollinger DB, Jacobsen VL, .** (1994) Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors. *Mol Cell Biol* 14:1909-1919.

- Widner H, Tetrud J, Rehncrona S, Snow B, Brundin P, Gustavii B, Bjorklund A, Lindvall O, Langston JW** (1992) Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med* 327:1556-1563.
- Willmarth NE, Ethier SP** (2006) Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 281:37728-37737.
- Wilson L, Maden M** (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282:1-13.
- Winer JB, Bang B, Clarke JR, Knox K, Cook TJ, et al.** (1992). A study of neuropathy in HIV infection. *Quarterly journal of medicine* 83:473-88.
- Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW** (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25:79-91.
- Woo RS, Li XM, Tao Y, Carpenter-Hyland E, Huang YZ, et al.** (2007). Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron* 54:599-610.
- Wrana JL, Attisano L** (2000) The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:5-13.
- Xu Z, Ford GD, Croslan DR, Jiang J, Gates A, et al.** (2005). Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression. *Neurobiology of disease* 19:461-70.
- Yamada K, Ichino N, Nishii K, Sawada H, Higashiyama S, Ishiguro H, Nagatsu T** (2000) Characterization of the human NTAK gene structure and distribution of the isoforms for rat NTAK mRNA. *Gene* 255:15-24.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez AP, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K** (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-6636.
- Yang X, Kuo Y, Devay P, Yu C, Role L** (1998) A cysteine-rich isoform of neuregulin controls the level of expression of neuronal nicotinic receptor channels during synaptogenesis. *Neuron* 20:255-270.
- Yarden Y, Sliwkowski MX** (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137.
- Yoon K, Gaiano N** (2005) Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8:709-715.
- Zheng CH, Feng L** (2006) Neuregulin regulates the formation of radial glial scaffold in hippocampal dentate gyrus of postnatal rats. *J Cell Physiol* 207:530-539.

Chapitre II

CRD-NRG, l'isoforme de type III codée par *NRG-1* module la différenciation neuronale et oligodendrogliale des cellules souches nerveuses *in vitro*

1. Introduction

Chez tous les êtres vivants, la mise en place des divers tissus et organes requiert une régulation extrêmement contrôlée de l'expression des gènes, régulation aussi bien spatiale que temporelle. Cette régulation de l'expression génique ne se résume pas à la seule transcription puisque d'autres mécanismes comme la maturation de l'ARN (modification, épissage, polyadénylation), le contrôle de l'export de l'ARN messager vers le cytoplasme, la traduction et les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, les modifications post-traductionnelles (glycosylation, acétylation, ...) sont autant d'étapes indispensables à la synthèse et l'adressage d'une protéine fonctionnelle dont l'activité pourra dépendre de sa localisation cellulaire, d'un éventuel clivage ou encore de phosphorylations. Outre les processus que nous venons brièvement d'évoquer, l'activité d'une protéine peut également dépendre de son(es) éventuelle(s) interaction(s) avec d'autres partenaires protéiques qui ensemble formeront en complexe actif.

Nous venons de détailler, dans le chapitre précédent, les rôles connus des Neurégulines-1 dans les processus de prolifération et de différenciation des cellules souches nerveuses au cours de l'ontogenèse. Rappelons qu'à côté de leur signalisation classique via une interaction entre leur domaine EGF extracellulaire et les récepteurs ErbB, ces facteurs de croissance semblent capables d'une signalisation « *reverse* ou *backward* » par clivage de la forme transmembranaire suivi par la translocation de leur domaine intracellulaire vers le noyau, ce qui rend ce système conceptuellement proche des membres de la famille Notch. Dans le système Notch impliqué dans le choix d'un destin cellulaire, la partie intracellulaire du récepteur est clivée après interaction avec le ligand et est ensuite transloquée dans le noyau où elle peut orienter l'expression de gènes en interagissant avec divers partenaires protéiques (Chibas, 2006).

Dans ce chapitre, nous démontrons que la forme transmembranaire de CRD-NRG, l'isoforme protéique codée par *Nrg-1* et exprimée par les cellules souches nerveuses en cultures, est clivée et que le domaine intracellulaire est transloqué dans le compartiment nucléaire de ces cellules. Dans le noyau, le domaine intracellulaire de CRD-NRG interagit avec des protéines du complexe de remodelage chromatinien Swi/Snf. Cette interaction est nécessaire au choix de destin neuronal et oligodendroglial des cellules souches nerveuses.

2. Résultats

2.1. Localisation des domaines extra- et intracellulaire

Il a précédemment été démontré que la principale isoforme de Nrg-1 exprimée par les cellules souches nerveuses en culture est la forme transmembranaire CRD-NRG (Cystein-Rich Domain), l'isoforme de type III de Nrg-1 (Calaora et al. 2001). En outre, l'utilisation d'une forme recombinante et soluble d'un récepteur aux Neurégulines (sErbB3) qui inhibe la liaison des Neurégulines à leurs récepteurs induit *in vitro* une mort prématuée des cellules souches nerveuses, une diminution de leur prolifération et enfin une différenciation préférentielle des cellules souches nerveuses survivantes en oligodendrocytes.

Une partie du moins de ces effets biologiques pourraient être liés au clivage de CRD-NRG. En effet, des expériences d'expression hétérologue ont démontré que CRD-NRG, caractérisée par la présence de deux domaines transmembranaires, subissait un clivage régulé du domaine extracellulaire et du domaine intracellulaire (Cabedo et al., 2002 ; Schroering et Carey, 1998 ; Frenzel et Falls, 2001). Plus récemment, il a été démontré que le domaine intracellulaire de CRD-NRG était spécifiquement adressé au noyau après clivage, notamment dans les neurones où il aurait dans ce cas un effet positif sur la survie neuronale (Bao et al., 2003).

Afin de déterminer si le clivage et l'adressage des domaines extra- et intracellulaire différait en fonction du type cellulaire, nous avons réalisé des western blots sur des extractions protéiques compartimentales (fraction cytoplasmique, membranaire et nucléaire) réalisées à partir de culture virtuellement pures de cellules souches nerveuses, de neurones, d'oligodendrocytes et d'astrocytes. Dans un premier temps, nous avons vérifié la qualité de l'extraction compartimentale par western blot en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre une protéine dont on savait par ailleurs qu'elle était présente uniquement au niveau d'un de ces compartiments : la Hsp70 pour la fraction cytoplasmique (heat-shock protein de 70 kDa), la flotilline qui est une protéine membranaire et enfin l'histone H3 présente uniquement dans les noyaux (figure 2.1).

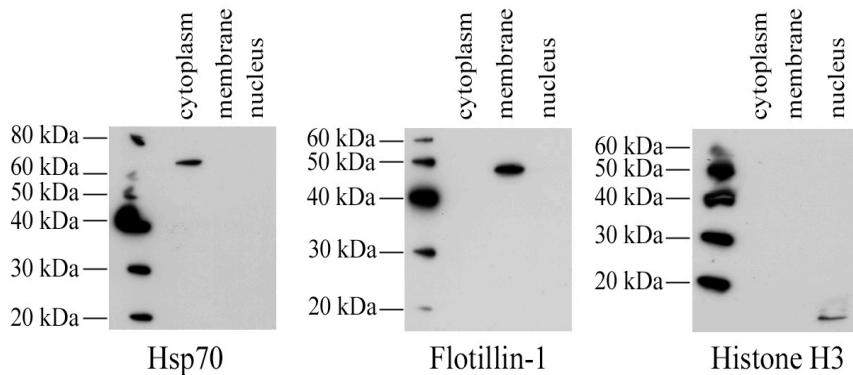


Figure 2.1. Validation des extractions compartimentales. Analyses par western blots réalisées sur des extractions compartimentales de cellules souches nerveuses à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement des protéines présentes dans chaque compartiment. Les résultats montrent un signal correspondant à la Hsp70 uniquement au niveau des extraits protéiques préparés à partir du cytoplasme, à la flotilline dans les extraits réalisés sur la préparation membranaire alors que la présence d'histone H3 n'est détectée qu'au niveau des extraits protéiques provenant des noyaux cellulaires.

Nous avons ensuite utilisé ces mêmes extraits protéiques pour localiser les domaines extra- et intracellulaire de CRD-NRG par western blots dans les différents types cellulaires. Nous avons cependant été rapidement confrontés à de nombreux problèmes de spécificité de reconnaissance en utilisant différentes préparations d'anticorps polyclonaux commerciaux. En effet, ainsi que nous l'avons signalé, il existe quatre gènes codant pour les Neurégulines et toutes les formes protéiques issues de ces gènes contiennent au moins le domaine EGF. Or la plupart des anticorps commerciaux ont été préparés contre un épitope de ce domaine. Devant les difficultés de spécificité auxquelles nous avons été confrontés, nous avons finalement décidé de préparer nous-mêmes un anticorps monoclonal ne reconnaissant qu'un seul épitope.

Nous avons donc immunisé des souris avec une forme purifiée recombinante de CRD-NRG exprimée en hôte procaryote. Nous avons sélectionné 5 clones reconnaissant CRD-NRG. Ainsi, le clone D11, une immunoglobuline de type IgG₂κ, permet d'obtenir un signal lorsqu'on utilise cet anticorps monoclonal comme anticorps primaire en immunofluorescence sur une culture de cellules souches nerveuses connues pour exprimer la forme CRD-NRG. Nous avons ensuite utilisé une lignée cellulaire n'exprimant pas de Neurégulines, la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary cells) qui a été transfectée à l'aide de plasmides permettant une expression soit du fragment extracellulaire de CRD-NRG, soit du fragment intracellulaire. Dans les deux cas, les constructions plasmidiques ont été réalisées en phase permettant d'exprimer la protéine recombinante fusionnée à un épitope dérivé des protéines P et V respectivement d'un parvomyxovirus et d'un virus simien, l'épitope V5.

Nous avons également obtenus des transfectants stables de cellules CHO par sélection à l'aide de l'antibiotique approprié. Nous avons ainsi pu démontrer de manière conclusive que l'anticorps D11 reconnaissait le domaine extracellulaire de CRD-NRG (figure 2.2).

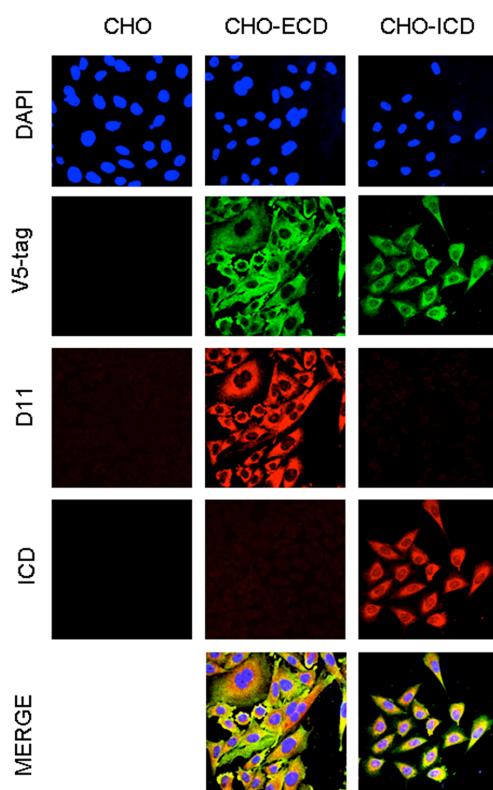


Figure 2.2. Caractérisation de l'anticorps monoclonal D11. Immunocytofluorescences réalisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope V5 sur des cultures de CHO sélectionnées et exprimant de manière stable après transfection soit le domaine ECD, soit le domaine ICD de CRD-NRG. Contrairement aux cellules non transfectées, on peut observer une immunoréactivité dans ce cas. Les immunomarquages réalisés à l'aide de l'anticorps monoclonal D11 permettent une reconnaissance uniquement des CHO exprimant spécifiquement le domaine extracellulaire. Les signaux obtenus à l'aide de l'anticorps anti-V5 et de l'anticorps D11 se superposent. L'utilisation d'un anticorps polyclonal commercial dirigé contre un épitope d'ICD ne permet de reconnaître que les CHO transfectées à l'aide d'un plasmide permettant une surexpression de cette région de CRD-NRG. Dans ce cas également, les signaux obtenus à l'aide de l'anticorps anti-V5 et de l'anticorps commercial se superposent parfaitement.

A l'aide de l'anticorps D11, nous avons pu localiser précisément le domaine extracellulaire de CRD-NRG dans les extraits protéiques compartimentaux réalisés à partir des différents types cellulaires. Concrètement, on observe une image identique dans le cas des extraits provenant des cellules souches nerveuses et des neurones : nous obtenons un signal d'environ 140 kDa dans la fraction membranaire qui correspond à la protéine mature non-clivée (Frenzel et Falls, 2001) et un signal de 29 kDa présent dans le cytoplasme qui constitue vraisemblablement une forme sécrétée (Liu et al, 1998). Par contre, dans les extraits protéiques préparés à partir des cultures d'astrocytes, outre le signal de 29 kDa que l'on retrouve dans la fraction cytoplasmique, on observe deux autres signaux : l'un de 43 kDa environ présent aussi dans le cytoplasme et l'autre signal, d'environ 110 kDa, présent dans les extraits protéiques membranaires. Ces deux signaux qui ne sont pas présents dans les cellules souches nerveuses ni dans les neurones peuvent s'expliquer par le fait que l'anticorps monoclonal D11 reconnaît non seulement le type III des Neurégulines codées par *Nrg-1* mais également le type I. En

effet, plusieurs groupes ont déjà démontré que les astrocytes exprimaient les Neurégulines-1 de type I dont la forme sécrétée NDF de 43 kDa. De plus, la forme mature et non-clivée du type I a un poids moléculaire inférieur à celui du type III. Enfin, dans les extraits protéiques préparés à partir des oligodendrocytes, nous retrouvons la forme sécrétée de 29 kDa dans la fraction cytoplasmique et la forme membranaire de 140 kDa. Cependant, nous observons également un signal de 120 kDa présent dans le cytoplasme et qui pourrait être la pro-protéine comme cela a été suggéré par Wang et al (2001) (figure 2.3).

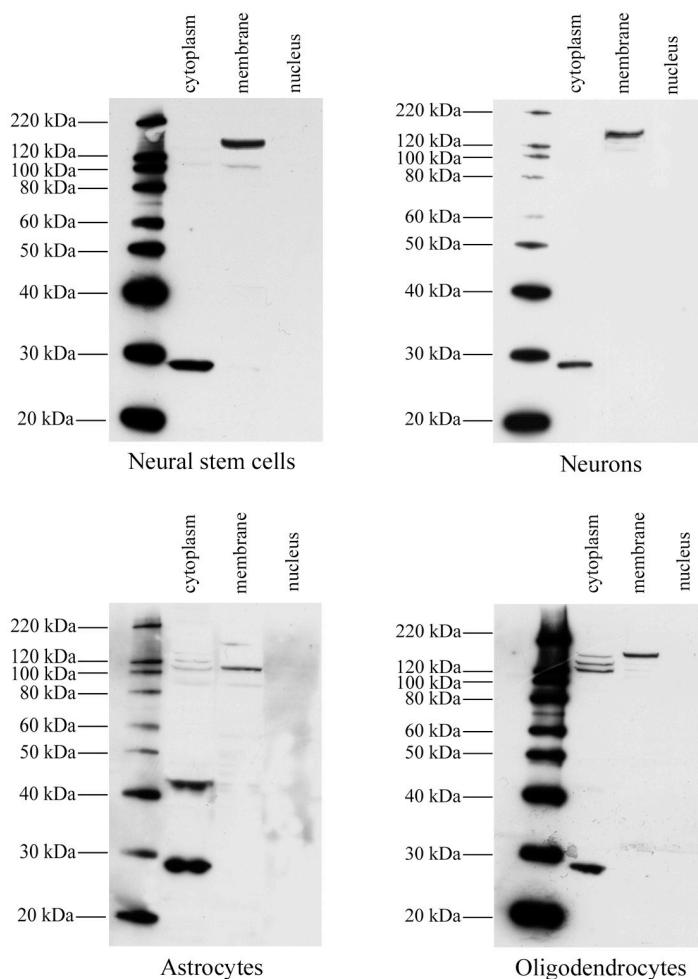


Figure 2.3. Distribution du domaine extracellulaire de Nrg-1 au niveau subcellulaire dans des cultures de divers types cellulaires.

Analyses par western blots réalisées à l'aide de l'anticorps monoclonal D11 sur des extractions compartimentales montrant la présence de la forme mature et non-clivée de CRD-NRG (140 kDa) ancrée dans la membrane et d'une forme sécrétée du domaine extracellulaire (29 kDa) dans l'extrait protéique cytoplasmique des cellules souches nerveuses et des neurones en culture. Dans les extraits réalisés à partir d'astrocytes en culture, on observe une forme membranaire de 110 kDa correspondant aux isoformes de Nrg-1 de type I, ainsi qu'un signal de 43 kDa (forme sécrétée des Nrg-1 de type I ou NDF). Dans les extraits préparés à partir d'oligodendrocytes en culture, les formes de 140 kDa et de 29 kDa sont également présentes ainsi qu'un signal de 120 kDa dans la fraction cytoplasmique.

En utilisant un anticorps polyclonal commercial sur les extraits protéiques compartimentaux préparés à partir des mêmes types cellulaires, on observe un signal de 55 kDa présent à la fois dans les extraits protéiques membranaires mais également nucléaires (figure 2.4). De plus étant donné que nous avons chargé sur les pistes du gel d'électrophorèse une quantité de protéine identique pour les extraits cytoplasmiques, membranaires et nucléaires et ce, quel que soit le type de cellule à partir desquelles les

extraits protéiques ont été réalisés, on peut conclure que la majorité du domaine intracellulaire de CRD-NRG clivé au niveau membranaire a été transloqué dans le noyau dans tous les types cellulaires testés. Notons par ailleurs dans ce contexte, qu'aucun signal qui pourrait correspondre au seul domaine extracellulaire après clivage de la forme transmembranaire n'a pu être observé au niveau membranaire puisqu'à la figure 2.3, un tel signal n'est pas observé. Ceci suggère que soit l'épitope reconnu par l'anticorps D11 est détruit par le clivage, soit encore que le clivage ne permet pas de maintenir le domaine ECD au niveau membranaire un temps suffisamment long pour pouvoir le détecter sous cette forme après extraction protéique.

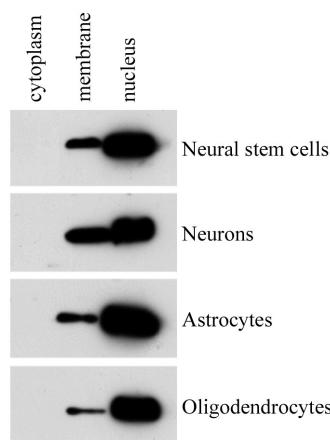


Figure 2.4. Localisation du domaine intracellulaire dans les cellules souches nerveuses proliférantes et différencierées.

Une analyse par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale des isoformes transmembranaires codées par *Nrg-1* permet d'observer un signal de 55 kDa dans les extraits de protéines membranaires et nucléaires réalisés à partir des quatre types cellulaires en culture.

2.2 Effet de la modulation de l'expression des Neurégulines-1 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses en culture

Afin de déterminer le rôle des Neurégulines-1 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses, nous avons dans un premier temps invalidé l'expression de ce gène. Par ailleurs, il nous est également semblé intéressant d'invalider l'expression des gènes *ErbB2* et *ErbB4* qui codent pour les récepteurs des Neurégulines exprimés par les cellules souches nerveuses. Rappelons que l'invalidation du gène *Nrg-1* ou encore des récepteurs *ErbB2* ou *ErbB4* chez la souris est caractérisée par une mort *in utero* précoce, n'autorisant pas ou très difficilement la culture de cellules du système nerveux qui proviendraient de ces animaux Knock-out.

C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'utiliser la technique de « RNA interférence » qui consiste à inhiber sélectivement l'expression d'un gène spécifique en utilisant par exemple des siRNA. Après transfection de cellules souches nerveuses

dissociées par des siRNA dirigés spécifiquement contre l'expression de *Nrg-1*, de *ErbB2* ou de *ErbB4*, nous avons vérifié dans un premier temps l'efficacité d'inhibition d'expression de ces siRNA. Nous avons procédé à des western blots sur des extraits protéiques réalisés 3 jours après la transfection en utilisant comme anticorps primaire un anticorps dirigé contre l'actine et un anticorps dirigé soit contre le domaine extracellulaire de CRD-NRG, soit contre ErbB2 ou encore contre ErbB4. A la figure 2.5, on peut observer une diminution de l'intensité du signal dans les extraits protéiques réalisés à partir des cellules transfectées à l'aide du siRNA spécifique par rapport au signal obtenu dans les conditions contrôles. Par ailleurs, cette diminution n'est pas observée lorsque les cellules sont transfectées à l'aide d'un siRNA sensé ne reconnaître aucune séquence exprimée par le génome de la souris (siRNA *non-target*) soit encore lorsque les cellules sont transfectées à l'aide d'un siRNA reconnaissant spécifiquement le RNA messager codant pour la géphyrine (GPHN), une protéine dont l'activité n'influence pas la prolifération ou la différenciation des cellules souches nerveuses.

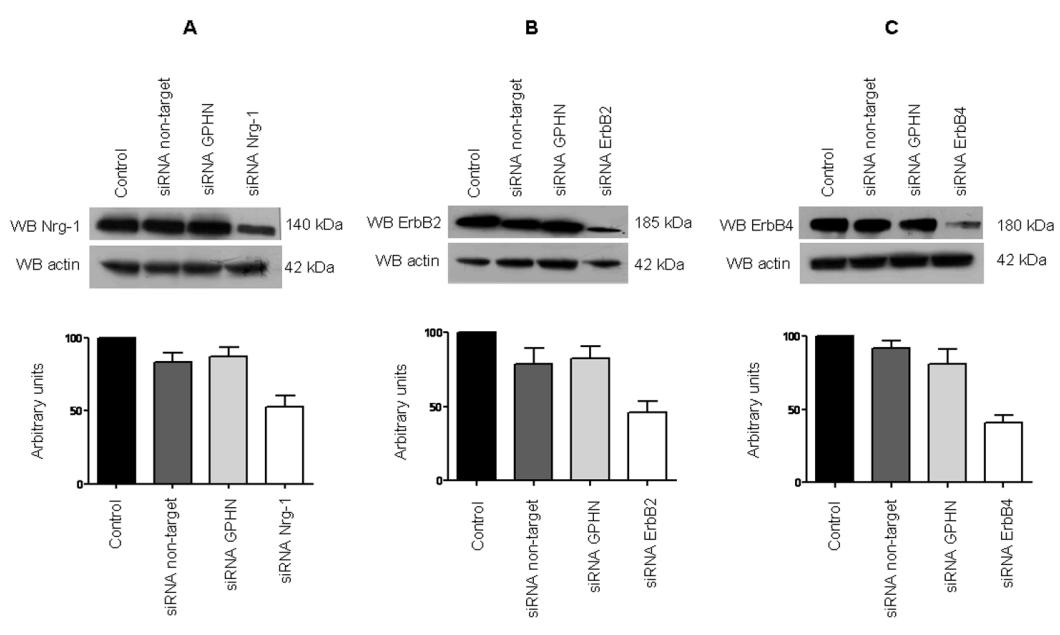


Figure 2.5. Inhibition de l'expression des gènes *Nrg-1*, *ErbB2* et *ErbB4* dans les cellules souches nerveuses en culture après transfection à l'aide de siRNA. Trois jours après la transfection de cellules souches nerveuses en culture à l'aide des différents siRNA, les protéines totales ont été extraites des cultures et analysées par western blots en utilisant des anticorps dirigés contre *Nrg-1*, *ErbB2* et *ErbB4*. Les conditions contrôles sont constituées de cellules souches nerveuses non-transfектées, de cellules transfectées à l'aide d'un siRNA *non-target* et de cellules transfectées à l'aide d'un siRNA dirigé contre l'expression de la GPHN. L'intensité du signal obtenu dans les différentes conditions pour les différents western blots a été quantifiée par densitométrie à l'aide du programme software ImageMaster 1D Prime est normalisée par rapport au signal actine. Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentages relatifs à l'intensité du signal mesuré dans les extraits protéiques provenant de cellules souches nerveuses non transfectées fixées arbitrairement à 100%. Comme on le constate, la procédure de transfection en elle-même inhibe l'expression du gène cible de 10 à 15% et la transfection à l'aide des siRNA spécifiquement dirigés contre chaque gène cible est suivie d'une inhibition d'expression oscillant entre 45 et 55% dans le cas respectif de *Nrg-1* (graphe A), *ErbB2* (graphe B) et *ErbB4* (graphe C).

Nous avons ensuite analysé l'effet de l'inhibition transitoire de l'expression de ces trois gènes sur la prolifération. Trois jours après transfection, les cellules ont été fixées à la paraformaldehyde, nous avons procédé à des immunomarquages à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 (qui est un marqueur de cellules en cycle) et nous avons compté la proportion de cellules en cycles dans chaque condition (figure 2.6A).

Nous observons une diminution du nombre de cellules Ki67-positives lorsqu'elles ont été transfectées à l'aide de siRNA dirigés contre l'expression de *Nrg-1*, de *ErbB2* ou de *ErbB4*. Nous avons ensuite analysé les effets de l'inhibition de l'expression de ces trois gènes sur la différenciation des cellules souches nerveuses et pour cela, les cellules ont été fixées cinq jours après la transfection. Des immunomarquages à l'aide d'anticorps reconnaissant un marqueur spécifique de chaque type cellulaire (anticorps Tuj1 reconnaissant la β III-tubuline pour les neurones, O4 reconnaissant un sulfatide membranaire des oligodendrocytes et anti-EAAT1 reconnaissant un transporteur d'acides aminés excitateurs spécifique des astrocytes) ont été réalisés et les proportions de cellules ont été ensuite comptées. On observe une diminution significative du nombre de neurones et d'oligodendrocytes lorsque les cellules souches ont été transfectées à l'aide des siRNA ciblant l'expression de *Nrg-1* (figure 2.6B-C). Par contre, on n'observe aucune différence significative en ce qui concerne la différenciation astrogliale (figure 2.6D). De plus, aucun effet n'est observé sur la différenciation cellulaire avec les siRNA contrôles ou encore en utilisant des siRNA ciblant *ErbB2* ou *ErbB4*. Cette dernière observation est très importante car elle suggère que l'effet des siRNA dirigés contre *Nrg-1* sur la différenciation neuronale et oligodendrogliale n'implique pas une signalisation classique requérant une interaction du domaine EGF avec les récepteurs ErbB2 et ErbB4.

En d'autres termes, cette observation suggère donc une implication spécifique de la partie intracellulaire des isoformes *Nrg-1* dans la différenciation neuronale et oligodendrogliale des cellules souches nerveuses en culture plutôt qu'une implication du domaine extracellulaire.

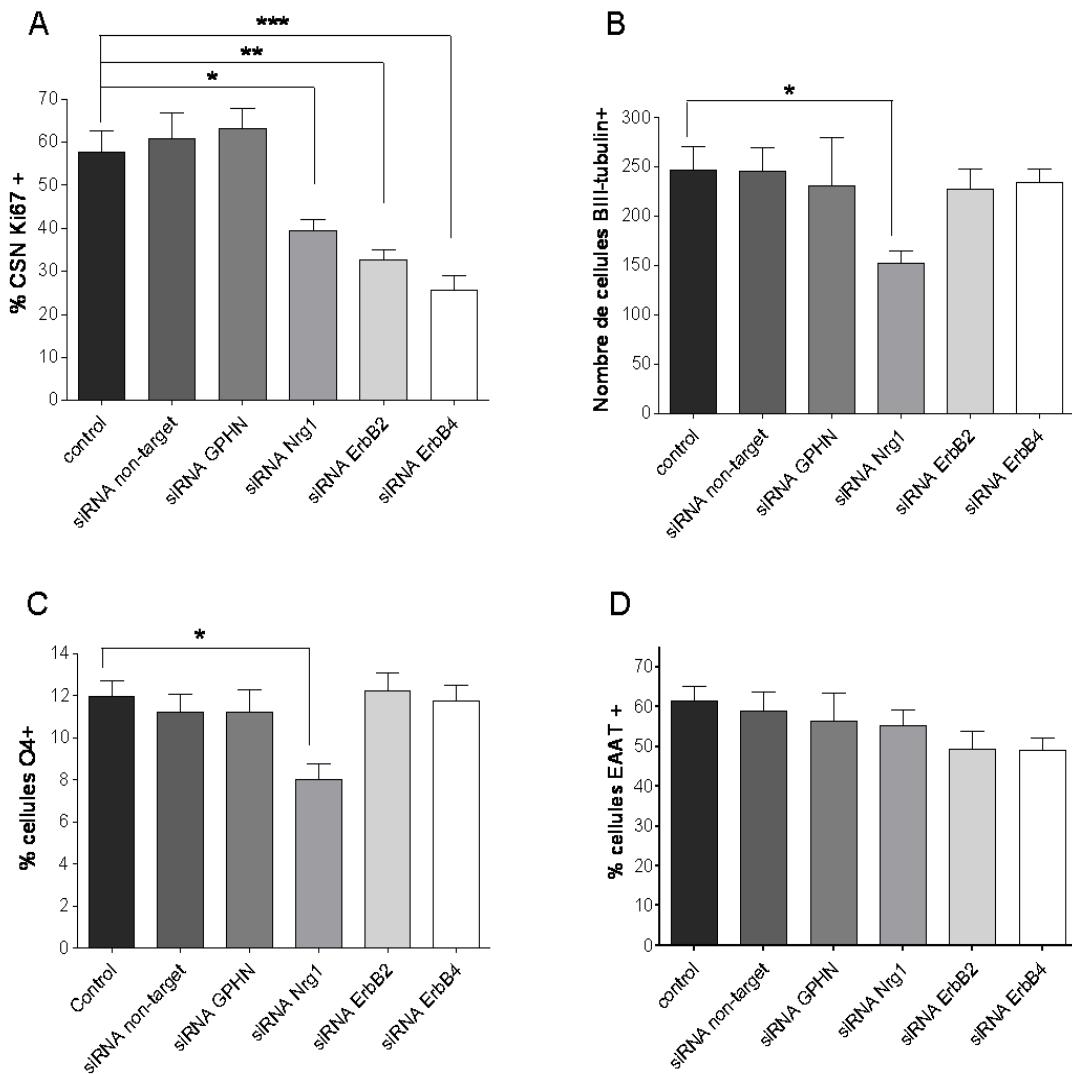
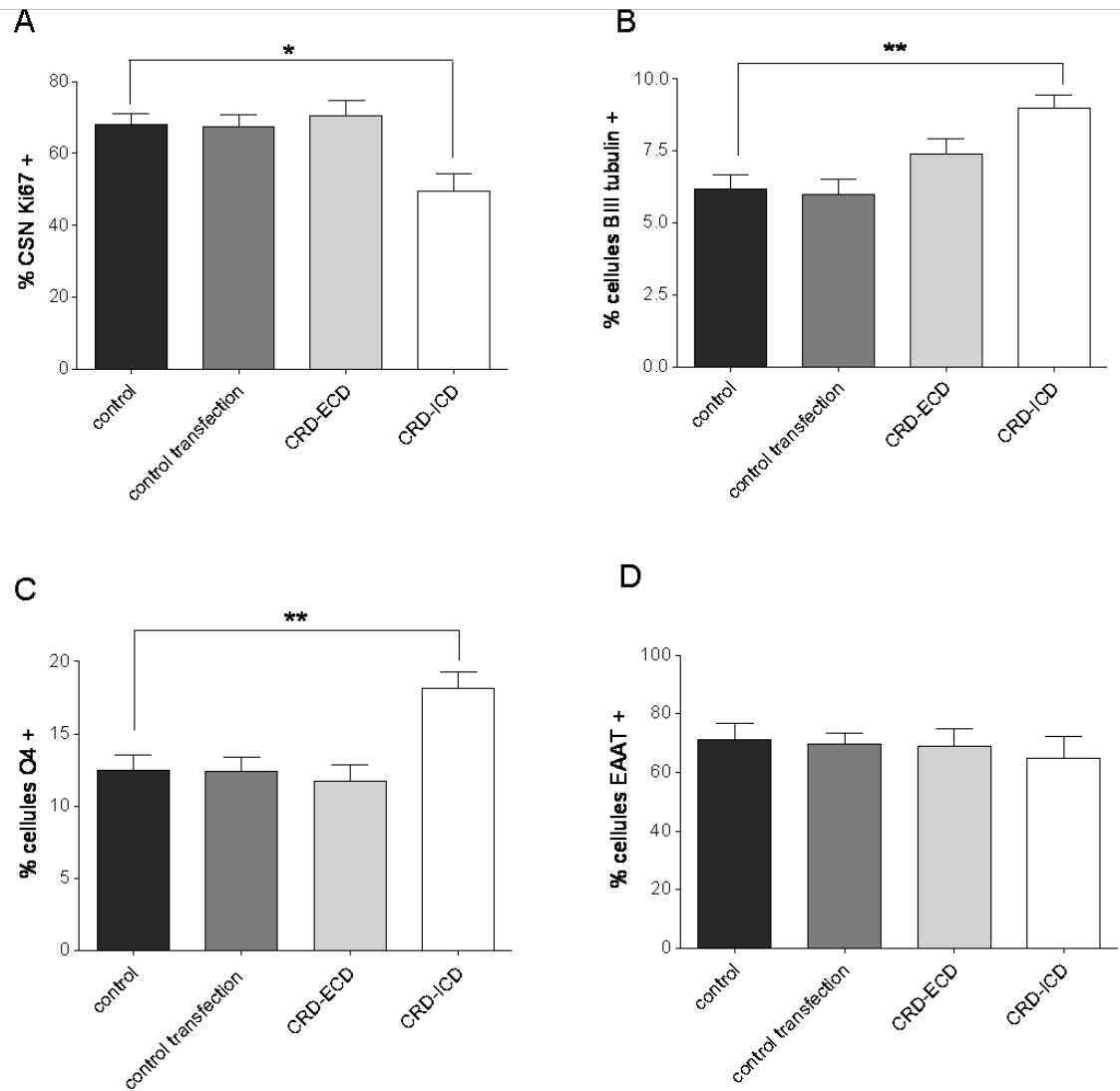


Figure 2.6. Effets sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses en culture de l'inhibition de l'expression de *Nrg-1*, de *ErbB2* et de *ErbB4* (A) L'inhibition par transfection de siRNA de l'expression de *Nrg-1*, *ErbB2* et *ErbB4* induit une diminution du nombre de cellules souches nerveuses en cycle. Trois jours après transfection, les cellules ont été fixées par de la paraformaldéhyde et nous avons réalisé un immunomarquage en utilisant un anticorps anti-Ki67. Nous avons ensuite sélectionné au hasard vingt champs par lamelle en comptant deux lamelles par transfection et un total de huit transfections (N=8). Nous avons ensuite compté le nombre de cellules Ki67 positives par rapport au nombre total de cellules quantifié par comptage des noyaux (colorés au DAPI). Pour les études de différenciation, les cellules ont été fixées cinq jours après la transfection à l'aide des différents siRNA et utilisées pour différents immunomarquages. (B) En utilisant un anticorps dirigé contre la β III-tubuline (un marqueur spécifique des neurones), nous observons une diminution du nombre de neurones uniquement dans les cultures transfectées à l'aide du siRNA dirigé contre l'expression de *Nrg-1* et non avec les siRNA dirigés contre l'expression de *ErbB2* et de *ErbB4*. (C) L'immunomarquage avec l'anticorps O4 (qui reconnaît un sulfatide membranaire spécifiquement exprimé par les oligodendrocytes) révèle également une diminution du nombre d'oligodendrocytes uniquement dans le cas des transfections à l'aide des siRNA dirigés contre l'expression *Nrg-1*. (D) En comptabilisant les nombres d'astrocytes à l'aide d'un anticorps anti-EAAT1 (un transporteur d'acides aminés excitateurs spécifiquement exprimé par les astrocytes), aucune modification n'a été observée. La proportion de cellules différencierées a été quantifiée comme décrit précédemment, excepté pour le graphe (B) où les résultats sont exprimés en nombre total de neurones par lamelles. Nous avons utilisé une Anova 1 suivi d'un post-test de Tukey pour les analyses statistiques (*, ** et *** représentent respectivement p<0.05, p < 0.01 et p < 0.0005).

Dans un second temps, nous avons surexprimé les domaines extra- et intracellulaire de CRD-NRG dans les cellules souches nerveuses en culture en transfectant ces cellules à l'aide de vecteurs d'expression. Dans ce cas également, nous avons ensuite mesuré l'effet de cette surexpression sur la prolifération et différenciation des cellules souches nerveuses en utilisant une approche méthodologique identique à celle utilisée à la figure 2.6. Trois jours après la transfection, les cellules ont été fixées, un immunomarquage à l'aide d'anticorps anti-Ki67 a été réalisé et un comptage de la proportion de cellules immunomarquées a été réalisé (figure 2.7A). On constate une diminution de la proportion de cellules Ki67-positives lorsqu'elles ont été transfectées à l'aide d'un plasmide permettant une surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG alors que les cellules qui surexpriment le domaine extracellulaire après transfection ne sont pas stimulées à proliférer, c'est-à-dire que la proportion de cellules Ki67-positives dans cette condition est semblable à celle observée dans les conditions de base. Lorsqu'on fixe la culture à la paraformaldéhyde 5 jours après la transfection, qu'on réalise ensuite une étude de la différenciation par immunomarquage anti- β III-tubuline pour les neurones, anti-O4 pour les oligodendrocytes et anti-EAAT1 pour les astrocytes suivi d'un comptage des proportions de chaque type cellulaire, on observe une augmentation du nombre de neurones et d'oligodendrocytes lorsque les cellules souches nerveuses ont été transfectées à l'aide d'un plasmide permettant la surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG (figure 2.7B-C). En revanche, aucune différence du nombre d'astrocytes n'est observée (figure 2.7D) dans le cas des cellules souches nerveuses transfectées en utilisant un plasmide permettant l'expression des domaines extra- ou intracellulaires de CRD-NRG. De même, le nombre de neurones ou d'oligodendrocytes ne varie pas lorsque les cellules souches nerveuses ont été transfectées cinq jours plus tôt à l'aide d'un plasmide permettant la surexpression du domaine extracellulaire de CRD-NRG.

L'ensemble de ces résultats suggère encore une fois un effet du domaine intracellulaire de CRD-NRG sur la différenciation neuronale et oligodendrogliale des cellules souches nerveuses *in vitro* et qui ne requiert donc pas une interaction avec les récepteurs ErbB puisque cette interaction se fait via le domaine extracellulaire.



Figures 2.7. Le domaine intracellulaire de CRD-NRG module la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses. Les domaines extra- et intracellulaire de CRD-NRG (respectivement CRD-ECD et CRD-ICD) ont été clonés dans un vecteur pcDNA3.1/V5/His-TOPO et nous avons transfecté les cellules souches nerveuses à l'aide de ces plasmides. (A) La surexpression du domaine intracellulaire (CRD-ICD) mais non du domaine extracellulaire (CRD-ECD) induit une diminution du nombre de cellules en prolifération ainsi qu'une augmentation du nombre de neurones (B) et d'oligodendrocytes (C). Par contre, au niveau de la différenciation astrogliale, aucune différence n'est observée dans les deux types de surexpression (D). Nous avons sélectionné au hasard vingt champs par lamelle en comptant deux lamelles par transfection et un total de huit transfections (N=8). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de cellules quantifié par comptage de noyaux colorés au DAPI. Nous avons utilisé une Anova 1 suivi d'un post-test de Tukey pour les analyses statistiques (* et ** représentent respectivement p< 0.05 et p < 0.01).

Après transfection à l'aide d'un plasmide stimulant l'expression du domaine intracellulaire de CRD-NRG dans la culture de cellules souches nerveuses, nous observons donc une augmentation du nombre de neurones et d'oligodendrocytes sans que le nombre d'astrocytes ne soit modifié. On peut donc se poser la question de l'origine de ces neurones et de ces oligodendrocytes supplémentaires. Est-ce réellement un recrutement supplémentaire de cellules souches nerveuses qui sont « poussées » vers

un destin neuronal ou oligodendroglial, éventuellement aux dépend d'un destin autre, ou l'augmentation du nombre de neurones et d'oligodendrocytes ne serait que le reflet, dans ces conditions, d'un effet permettant une survie accrue de cellules souches nerveuses ayant choisi un destin nerveux ou oligodendroglial. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé deux expériences. Dans un premier temps, nous avons évalué le nombre de cellules apoptotiques après une transfection à l'aide de plasmides permettant une surexpression de domaines extra- ou intracellulaire de CRD-NRG. Trois jours après la transfection, la culture a été fixée en utilisant de la paraformaldéhyde et un test «TUNEL » quantifiant le nombre de cellules apoptotiques a été réalisé. Ce test permet de quantifier le nombre de cellules présentant un clivage internucléosomal de leur ADN. Dans ces conditions, nous n'observons aucune différence entre les conditions de transfection, ce qui indique que la surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG n'implique pas une survie cellulaire accrue (résultats non-montrés). D'autre part, nous avions déjà mesuré que la prolifération, évaluée par le nombre de cellules en cycle (nombre de cellules Ki67-positives), était inférieur dans le cas d'une surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG (figure 2.7A).

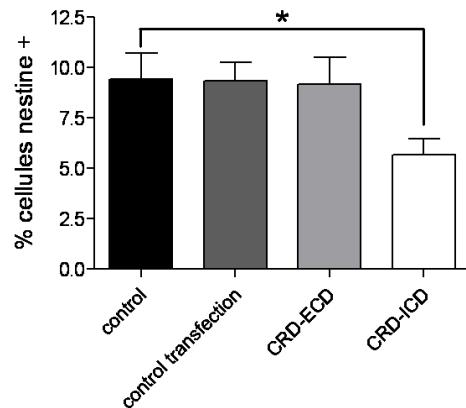


Figure 2.8. La surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG induit une diminution du nombre de cellules souches nestine-positives. Nous avons transfété les cellules souches nerveuses à l'aide des vecteurs pcDNA3.1/V5/His-TOPO contenant soit la séquence du domaine extracellulaire (CRD-ECD) soit la séquence du domaine intracellulaire (CRD-ICD). Cinq jours après transfection, nous avons fixé les cellules à la paraformaldehyde et réalisé un immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-nestine. Une diminution du nombre de cellules nestine-positives (et donc, toujours immatures) est observée dans les cultures de cellules souches nerveuses surexprimant le domaine intracellulaire. Nous avons sélectionné au hasard vingt champs par lamelle en comptant deux lamelles par transfection et un total de quatre transfctions (N=4). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules exprimant la nestine par rapport au nombre total de cellules quantifié par comptage des noyaux marqués au DAPI. Nous avons utilisé une Anova 1 suivi d'un post-test de Tukey pour les analyses statistiques (* représente $p < 0.05$).

Etant donné qu'après cinq jours de différenciation il persiste toujours quelques cellules souches nerveuses indifférenciées, nous avons réalisé la même expérience de transfection et de différenciation suivie cette fois d'un immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-nestine, une protéine spécifique des cellules immatures. Le comptage subséquent de la proportion des cellules nestine-positives (figure 2.8) indique que la stimulation de la différenciation neuronale et oligodendrogliale induite par la surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG se fait aux dépends de la proportion de cellules souches nerveuses. En d'autres termes, la surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG dans les cellules souches nerveuses stimule ces dernières à adopter un destin neuronal ou oligodendroglial. Par ailleurs, cette stimulation ne semble pas requérir une interaction avec les récepteurs ErbB2 et/ou ErbB4.

2.3 Interactions protéiques

Nous venons donc de démontrer que le domaine intracellulaire de CRD-NRG pouvait être clivé à partir de la protéine transmembranaire complète et une fois le clivage intervenu, ce domaine restait ancré dans la membrane ou était adressé au noyau des cellules souches nerveuses mais aussi au noyau des neurones, des astrocytes ou des oligodendrocytes en culture. De plus, ce domaine intracellulaire stimule le choix d'un destin neuronal ou oligodendroglial lorsqu'il est surexprimé dans une cellule souche nerveuse et cet effet ne semble pas nécessiter la présence des récepteurs ErbB2 et ErbB4. En effet, l'inhibition de l'expression de *Nrg-1*, à l'inverse de celle de *ErbB2* et de *ErbB4*, diminue la différenciation des cellules souches nerveuses cultivées en neurones et en oligodendrocytes. A l'instar du système Notch dont le domaine intracellulaire est transloqué dans le noyau où il interagit avec une autre protéine qui agit comme modulateur de la transcription, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le domaine intracellulaire des Neurégulines pouvait également interagir avec un ou plusieurs partenaires protéiques en étant transloqué dans le noyau. Il apparaissait donc à ce stade important de pouvoir identifier l'une ou l'autre de ces protéines pouvant interagir avec le domaine intracellulaire de CRD-NRG.

Nous avons utilisé plusieurs approches concomitantes afin de déterminer d'une part s'il existait une interaction entre le domaine intracellulaire et d'autres protéines et d'autre part l'identité de ces éventuelles protéines. Nous avons utilisé comme première

technique le double-hybride (en collaboration avec la firme Hybrigenics^o) en utilisant pour le criblage une banque de cDNA de cerveau de souris au stade embryonnaire E10.5-E12.5. Une construction plasmidique permettant l'expression du domaine intracellulaire de CRD-NRG en levures a été réalisée pour ce criblage. Plusieurs clones ont été identifiés par cette approche qui a donc consisté à permettre une complémentarité d'un facteur de transcription de levure en cas d'interaction entre la partie intracellulaire de Nrg-1 et une protéine exprimée par un clone de cette banque. Parmi les clones identifiés, un résultat nous a semblé particulièrement intéressant : BAF57 ou Smarce1 qui appartient au complexe de remodelage chromatinien. Ce complexe a la capacité de modifier la structure de la chromatine en déplaçant les nucléosomes afin de rendre certains gènes accessibles à la machinerie transcriptionnelle. Cette modification de la chromatine est possible grâce à l'activité ATPase de l'une des sous-unités du complexe de remodelage chromatinien ; cette sous-unité chez les mammifères est soit Brg1 soit Brm. L'activité enzymatique de Brg1 ou de Brm est modulée par les autres membres formant le complexe dont BAF57 (Brg/Brm Associated Factors).

Afin de valider les résultats obtenus en double-hybride nous avons procédé à des co-immunoprecipitations de protéines extraites de cellules souches nerveuses en culture en utilisant des anticorps anti-Nrg 1, anti-BAF57, anti-Brg1 et anti-Brm et nous avons ensuite réalisé des western blots à l'aide de ces mêmes anticorps en combinaison, ceci afin de déterminer si ces protéines pouvaient se retrouver dans un même complexe dans ces cellules. Nous obtenons un signal correspondant à Nrg-1 après précipitation à l'aide des anticorps dirigés contre BAF57 et Brm (figure 2.9A). De même, un signal BAF57 est présent après précipitation utilisant les anticorps dirigés contre Nrg1, Brg1 et Brm (figure 2.9B). Nous avons également identifié une interaction entre Brm et Nrg-1 après précipitation à l'aide des anticorps anti-BAF57 et anti-Nrg-1 (figure 2.9C). Enfin, la dernière analyse par western blots des protéines immunoprecipitées démontre que BAF57 interagit autant avec Brm qu'avec Brg-1 les deux sous-unités douées d'une activité ATPasique tandis que Nrg-1 n'interagit qu'avec Brm (figure 2.9D). En conclusion, dans les cellules souches nerveuses en culture, le domaine intracellulaire de Nrg-1 interagit avec BAF57 et spécifiquement avec Brm mais pas avec Brg1.

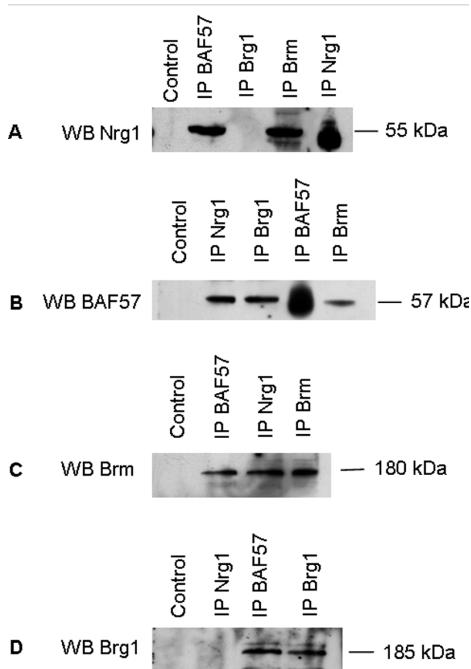


Figure 2.9. Le domaine intracellulaire de CRD-NRG interagit avec BAF57 et Brm. Les protéines totales de cellules souches nerveuses en culture ont été extraites et nous avons ensuite procédé à des immunoprécipitations. (A) Analyse par western blot réalisée à l'aide d'un anticorps anti-Nrg-1 sur des protéines immunoprécipitées en utilisant des anticorps anti-BAF57, anti-BRG1, anti-Brm et anti-Nrg-1. (B) Analyse par western blot utilisant un anticorps anti-BAF57 après immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-Nrg-1, anti-Brg1, anti-BAF57 et anti-Brm. (C) Immunoprécipitations utilisant des anticorps anti-BAF57, anti-Nrg-1 et anti-Brm suivies d'une analyse par western blot à l'aide des anticorps anti-Brm. (D) Analyse par western blot à l'aide d'anticorps anti-Brg1 après immunoprécipitations réalisées en utilisant les anticorps dirigés contre Nrg-1, BAF57 et Brg1. Nous avons utilisé comme contrôle négatif une analyse par western blot des protéines immunoprécipitées réalisées à l'aide d'un anticorps non-relevant (IgG de lapin). Ces résultats démontrent entre autres qu'une interaction entre les protéines Nrg-1, Brm et BAF57 existe dans les cellules souches nerveuses en culture.

Nous avons également utilisé la méthode du Tap-tag qui consiste à produire dans les cellules d'intérêt (soit dans ce cas, les cellules souches nerveuses) une protéine recombinante, c'est-à-dire la protéine-cible (le domaine intracellulaire de CRD-NRG) couplé à deux étiquettes ou *tag*. Ceux-ci sont des peptides permettant de réaliser une liaison à la streptavidine pour le premier et à la calmoduline pour le second. Après extraction des protéines des cellules souches nerveuses, cette approche permet de purifier la protéine-cible recombinante par deux chromatographies d'affinité successives. Les éventuelles protéines qui interagiraient avec elle sont également co-purifiées par ces deux chromatographies d'affinité. Cette approche impose de réaliser en fait deux constructions : l'une où les étiquettes (*tag*) sont présentes à l'extrémité N-terminale de la protéine-cible (NTAP) et l'autre où elles sont présentes à l'extrémité C-terminale (CTAP). Cette double construction est en effet nécessaire, ceci afin de s'assurer que la présence éventuelle des peptides-étiquettes ne provoque un encombrement stérique prévenant une interaction normale avec la protéine-cible et aboutissant à des résultats de type « faux-négatifs ». L'indéniable avantage de cette technique est de pouvoir étudier les interactions protéiques au sein même des cellules souches nerveuses.

Après construction des vecteurs, transfection des cellules souches nerveuses, extraction des protéines et purification sur les deux résines d'affinité, l'éluat obtenu a été analysé par western blots à l'aide d'anticorps dirigés contre Nrg-1, BAF57 et

également des anticorps dirigés contre Brg1 et Brm. Lorsqu'on surexprime le domaine intracellulaire de Nrg-1 dans ces conditions, on obtient bien un signal correspondant à Nrg-1, mais aussi à BAF57 et à Brm, ceci aussi bien dans l'éluat des cellules transfectées avec le vecteur CTAP que dans l'éluat des cellules transfectées avec le vecteur NTAP (figure 2.10).

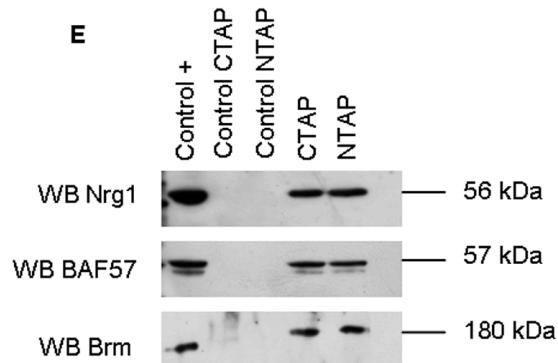


Figure 2.10. Le domaine intracellulaire de CRD-NRG interagit avec BAF57 et Brm dans des cellules souches nerveuses en culture. Le cDNA codant pour le domaine intracellulaire de Nrg-1 a été cloné dans les vecteurs CTAP et NTAP en phase (respectivement en C- et N-terminal) avec une séquence codant pour deux peptides-étiquettes permettant une interaction respectivement avec une résine de streptavidine et de calmoduline. Nous avons ensuite transfecté les cellules souches nerveuses à l'aide de ces plasmides d'expression. Deux jours après la transfection, nous avons extrait les protéines et purifié la protéine recombinante par deux étapes successives de chromatographie d'affinité. Les protéines interagissant éventuellement avec celle-ci ont été co-élues. Nous avons ensuite réalisé une analyse par western blot des protéines élues en utilisant des anticorps dirigés contre Nrg-1, BAF57 et Brm révélant la présence de ces trois protéines après purification.

2.4 Rôle de BAF57 dans la stimulation de la différenciation des cellules souches nerveuses par le domaine intracellulaire de Nrg-1

Nous venons de montrer que les Neurégulines-1 induisaient une augmentation de la différenciation neuronale et oligodendrogliale via leur domaine intracellulaire et que celui-ci interagissait avec deux protéines appartenant au complexe de remodelage chromatiniens : BAF57 et BRM. Afin de démontrer l'implication du complexe de remodelage chromatiniens dans la différenciation des cellules souches nerveuses induite par le domaine intracellulaire de Nrg-1, nous avons utilisé des lentivirus exprimant un shRNA (*small hairpin RNA*) dirigé contre la protéine BAF57 pour infecter des cellules souches nerveuses en culture. Les différentes conditions contrôles ont été ici des cellules non-infectées et des cellules infectées au moyen d'un lentivirus permettant l'expression d'un shRNA non-target, c'est-à-dire ne reconnaissant aucun transcript connu du génome murin. Rappelons que l'avantage d'une transduction (infection) par un

lentivirus est que virtuellement toutes les cellules de la culture sont transduites. Après infection à l'aide des lentivirus inhibant l'expression de *BAF57*, une partie des cellules souches nerveuses ont ensuite été transfectées à l'aide du plasmide permettant la surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG, afin de stimuler dans ces conditions la différenciation neuronale et oligodendrogliale des cellules souches nerveuses.

Cinq jours après la transfection des cellules souches nerveuses à l'aide du plasmide permettant la surexpression du domaine intracellulaire de Nrg-1, nous avons quantifié le nombre de cellules différencierées en neurones et en oligodendrocytes dans ces conditions en utilisant une approche semblable à celle décrite aux figures 2.6 et 2.7. Concernant la différenciation neuronale (figure 2.11), nous observons que la surexpression du domaine intracellulaire de Nrg-1 après transfection provoque une augmentation significative du nombre de neurones dans les cultures de cellules souches nerveuses en conditions contrôles, c'est-à-dire sans transduction par lentivirus ou transduites par les lentivirus exprimant le shRNA non-target, par rapport aux cultures de cellules souches nerveuses non transfectées. Ces résultats confirment les résultats précédemment obtenus (voir figure 2.7). Par contre, les cellules infectées à l'aide des lentivirus exprimant le shRNA dirigé contre *BAF57* sont caractérisées par une diminution du nombre neurones par rapport aux cellules non infectées ou infectées à l'aide des lentivirus exprimant le shRNA non-target. Par ailleurs, cette diminution n'est pas compensée lorsqu'on surexprime le domaine intracellulaire de Nrg-1. Nous pouvons donc interpréter ces résultats de la façon suivante : la différenciation neuronale des cellules souches nerveuses est stimulée par la présence du domaine intracellulaire de CRD-NRG et cette stimulation nécessite la présence concomitante de la protéine BAF57, ce qui semble donc impliquer le complexe de remodelage chromatinien Swi/Snf dans la différenciation des cellules souches en neurones. Notons qu'une approche différente vient également de suggérer un rôle de ce complexe dans la différenciation neuronale des cellules souches nerveuses (Lessard et al., 2007). Néanmoins ces auteurs n'ont pas mentionné une implication du domaine intracellulaire de Nrg-1 dans le complexe Swi/Snf responsable de la stimulation de la différenciation neuronale des cellules souches nerveuses.

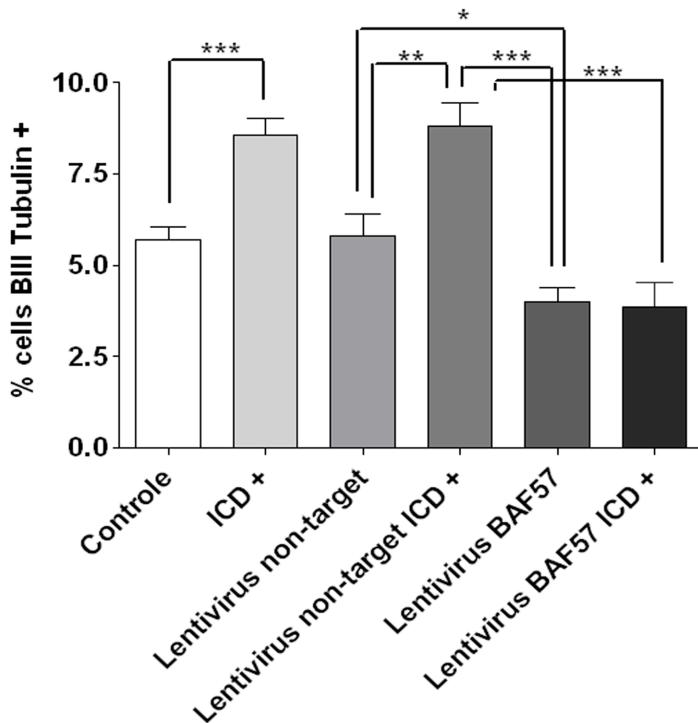


Figure 2.11. La différenciation neuronale des cellules souches nerveuses en culture et induite par le domaine intracellulaire de Nrg-1 est dépendante de la présence de BAF57. Les cellules souches nerveuses en culture ont été infectées à l'aide d'un lentivirus exprimant un shRNA non-target ou à l'aide d'un lentivirus exprimant un shRNA dirigé contre l'expression de *BAF57*. Une partie des cellules infectées a également été transfectée à l'aide du plasmide permettant de surexprimer le domaine intracellulaire de Nrg-1. Cinq jours après l'infection et ou la transfection, les cellules ont été fixées en utilisant de la paraformaldehyde et un immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti- β III-tubuline a été réalisé. Une augmentation du nombre de neurones est observée dans les cellules non infectées par le lentivirus et surexprimant le domaine intracellulaire de Nrg-1 (second histogramme en partant de la gauche). Lorsque les cellules ont été infectées au préalable par le lentivirus permettant l'expression du shRNA non-target, on n'observe aucune modification notable par rapport aux deux premières conditions (troisième et quatrième histogrammes en partant de la gauche). Par contre, dans le cas des cellules infectées à l'aide des lentivirus exprimant le shRNA dirigé contre *BAF57*, le nombre de neurones diminue de manière significative et cette diminution n'est pas compensée par la surexpression du domaine intracellulaire de Nrg-1. Pour la quantification de la proportion de neurones différenciés dans ces cultures de cellules souches nerveuses, nous avons sélectionné au hasard vingt champs par lamelle en comptant deux lamelles par transfection pour un total de huit transfections indépendantes ($N=8$). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de cellules quantifié par comptage des noyaux marqués au DAPI. Nous avons utilisé une Anova 1 suivi d'un post-test de Tukey pour les analyses statistiques et * représente $p < 0.05$; ** et *** représentent respectivement $p < 0.01$ et $p < 0.0005$.

Nous avons réalisé la même expérience d'invalidation de l'expression de *BAF57* et de surexpression concomitante ou non du domaine intracellulaire de Nrg-1 pour quantifier la différenciation oligodendrogliale dans ces conditions (figure 2.12). Celle-ci a été quantifiée après immunomarquage réalisé en utilisant un anticorps anti-04. Les résultats obtenus indiquent de nouveau une augmentation de la différenciation oligodendrogliale des cellules souches nerveuses en culture lorsque celles-ci surexpriment le domaine intracellulaire de Nrg-1 et ce, que les cellules aient été auparavant infectées à l'aide d'un lentivirus. Contrairement aux résultats obtenus dans

le cas de la différenciation neuronale, lorsque les cellules souches nerveuses ont été infectées à l'aide d'un lentivirus exprimant un shRNA dirigé contre *BAF57*, on n'observe pas de diminution du nombre d'oligodendrocytes différenciés par rapport aux conditions contrôles, et ce que les cellules souches nerveuses surexpriment ou non le domaine intracellulaire de Nrg-1. En d'autres termes, la stimulation de la différenciation oligodendrogliale par le domaine intracellulaire de Nrg-1 ne requiert pas la présence de *BAF57*, contrairement à la stimulation de la différenciation neuronale.

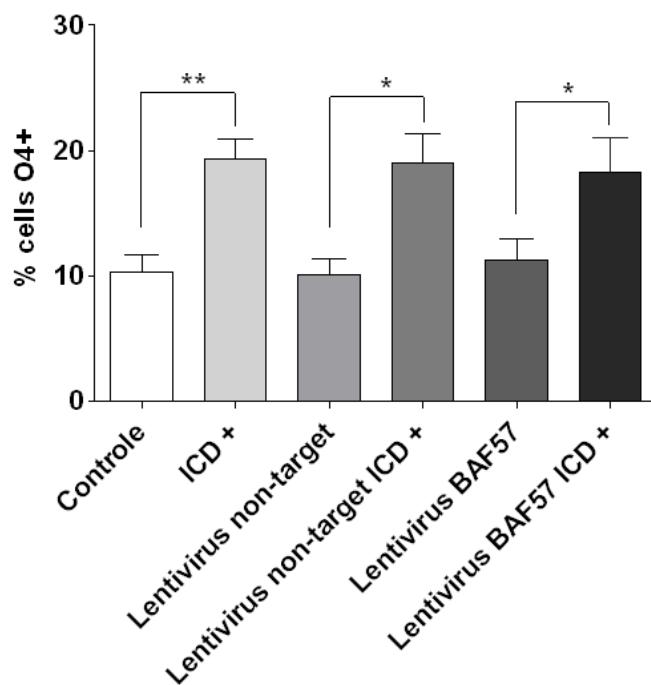


Figure 2.12. Le domaine intracellulaire influence la différenciation oligodendrogliale des cellules souches nerveuses en culture indépendamment de la présence de BAF57. Comme précédemment décrit, les cellules souches nerveuses en culture ont été infectées à l'aide d'un lentivirus exprimant soit un shRNA non-target, soit un shRNA dirigé contre *BAF57* ; par ailleurs, selon les conditions, elles ont été transfectées à l'aide d'un plasmide permettant une surexpression du domaine intracellulaire de Nrg-1. Cinq jours après l'infection et/ou la transfection, les cellules ont été fixées par de la paraformaldéhyde et nous avons réalisé des marquages immunofluorescents à l'aide d'un anticorps anti-O4, un marqueur d'oligodendrocytes. Le nombre d'oligodendrocytes augmente lorsque le domaine intracellulaire de Nrg-1 est surexprimé même lorsque les CSN ont été infectée par un shRNA. De plus, l'infection des cellules souches nerveuses en cultures par un lentivirus exprimant un shRNA dirigé contre *BAF57* n'a pas d'effets par elle-même en comparaison des conditions contrôles. La quantification a été réalisée par une sélection au hasard de vingt champs par lame en comptant deux lames par transfection pour un total de quatre transfections indépendantes (N=4). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de cellules quantifié sur la base du nombre de noyaux colorés au DAPI. Nous avons utilisé une Anova 1 suivi d'un post-test de Tukey pour les analyses statistiques et *représente p < 0.05 ; représente < 0.01

Références bibliographiques

- Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA** (2003) Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 161:1133-1141.
- Cabedo H, Luna C, Fernandez AM, Gallar J, Ferrer-Montiel A** (2002) Molecular determinants of the sensory and motor neuron-derived factor insertion into plasma membrane. *J Biol Chem* 277:19905-12.
- Calaora V, Rogister B, Bismuth K, Murray K, Brandt H, Leprince P, Marchionni M, Dubois-Dalcq M** (2001) Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro. *J Neurosci* 21:4740-4751
- Chiba S** (2006) Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* 24:2437-2447
- Frenzel KE, Falls DL** (2001) Neuregulin-1 proteins in rat brain and transfected cells are localized to lipid rafts. *J Neurochem* 77(1):1-12
- Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Staahl BT, Wu H, Aebersold R, Graef IA, Crabtree GR** (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 19;55(2):171-3.
- Liu X, Hwang H, Cao L, Wen D, Liu N, Graham RM, Zhou M** (1998) Release of the neuregulin functional polypeptide requires its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 273:34335-34340.
- Schroering A, Carey DJ** (1998) Sensory and motor neuron-derived factor is a transmembrane heregulin that is expressed on the plasma membrane with the active domain exposed to the extracellular environment. *J Biol Chem*. 273:30643-50
- Wang JY, Miller SJ, Falls DL** (2001) The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J Biol Chem*. 276(4):2841-51.

Chapitre III

Etude de l'expression des isoformes codées par *NRG-2* dans des cultures de cellules souches nerveuses. Rôles dans la prolifération et la différenciation

1. Introduction

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, il existe quatre gènes différents codant pour des Neurégulines. Par ailleurs, l'organisation structurelle des isoformes protéiques codées par *Nrg-1* et *Nrg-2* est assez semblable : en plus du domaine EGF qui signe l'appartenance à cette famille de facteurs de croissance et qui est impliqué dans l'interaction avec les récepteurs, ErbB, on observe dans les deux cas des formes transmembranaires et des formes sécrétées. Néanmoins, à notre connaissance, il n'existe aucune description décrivant un clivage des isoformes codées par *Nrg-2* et à fortiori, en cas de clivage éventuel, il n'existe aucune description d'un adressage particulier du domaine intracellulaire des isoformes *Nrg-2*. Dans la mesure où *Nrg-1* et *Nrg-2* encodent des isoformes protéiques caractérisées par une importante homologie de séquence en acides aminés, nous avons donc recherché un rôle éventuel des isoformes codées par *Nrg-2* dans la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses (CSN) en envisageant ici aussi un mode de fonctionnement pour une ou des isoforme(s) *Nrg-2* identique à celui décrit que nous venons de décrire dans le cas de l'isoforme de type III ou CRD-NRG codée par *Nrg-1*.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont fragmentaires en ce sens que nous n'avons pas encore eu le temps d'aboutir à une vue globale du rôle des isoformes *Nrg-2* telle que celle que nous avons envisagée dans le cas des isoformes *Nrg-1*. Cet aspect nous empêche d'envisager à l'heure actuelle une soumission de manuscrit. Néanmoins, dans la mesure où ces résultats laissent entrevoir des perspectives quant à une régulation fine du choix de destin cellulaire des cellules souches nerveuses modulée par les Neurégulines, qu'elles soient codées par *Nrg-1* ou *Nrg-2*, il nous a paru important de décrire ces résultats dans leur forme actuelle dans le présent mémoire.

2. Résultats

2.1 Localisation des domaines extra- et intracellulaire

Etant donné que l'organisation structurelle des isoformes protéiques de *Nrg-2* est proche de celles des isoformes codées par *Nrg-1*, nous avons d'abord recherché l'existence à la fois d'un clivage éventuel des protéines *Nrg-2* exprimées par les cellules souches nerveuses en culture et d'un adressage spécifique des fragments protéiques générés par ce clivage.

C'est la raison pour laquelle nous avons dans un premier temps procédé à une extraction compartimentale des protéines de cellules souches nerveuses en culture (*la technique d'extraction compartimentale utilisée dans ce cas est identique à celle décrite dans la publication jointe en annexe 2 à ce présent mémoire ; dans la mesure où la plupart des techniques utilisées dans ce présent chapitre sont identiques à des techniques utilisées au chapitre II et donc décrites dans le manuscrit de l'annexe 2, nous nous limiterons à la description de matériel et de méthodes spécifiques en fin de ce chapitre, au point 3*). Nous souhaitions réaliser une analyse par western blot de ces extraits protéiques compartimentaux. Un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire des isoformes codées par *Nrg-2* est disponible commercialement (*voir point 3*) mais il n'existe malheureusement aucun anticorps dirigé spécifiquement contre le domaine intracellulaire des isoformes *Nrg-2*. Nous avons donc décidé de générer un tel anticorps et nous avons opté pour un anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre le domaine intracellulaire des isoformes codées par *Nrg-2* en réalisant une immunisation de lapins à l'aide d'une séquence peptidique. La séquence de celle-ci a été choisie de manière à ce qu'elle ne soit pas présente dans les isoformes *Nrg-1* (*voir point 3*).

Afin de nous assurer de la spécificité de l'immunsérum de lapin ainsi obtenu, nous avons réalisé une première analyse par dot-blot (*voir point 3*) en déposant sur une membrane de PVDF du peptide spécifique de *Nrg-2* et ayant servi à réalisé l'immunisation des animaux et le peptide correspondant des isoformes *Nrg-1* (figure 3.1). Après avoir incubé la membrane successivement en présence d'immunsérum dirigé contre le domaine intracellulaire des isoformes *Nrg-2* et en présence d'un anticorps anti-IgG de lapin et couplé à la peroxydase, la révélation de ce dot-blot montre que seul le peptide correspondant à la séquence des isoformes *Nrg-2* est reconnu par l'immunsérum.

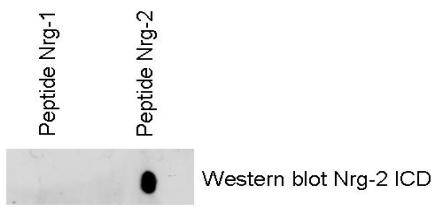


Figure 3.1. Validation de l'anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire des isoformes *Nrg-2*. Nous avons déposé 30 µg de peptide *Nrg-1* et 30 µg de peptide *Nrg-2* sur une membrane de PVDF. Après incubation en présence de l'immunsérum obtenu après injections du peptide correspondant à la séquence spécifique du domaine intracellulaire des isoformes *Nrg-2*, la révélation nous permet d'observer un signal uniquement à l'endroit où le peptide *Nrg-2* a été déposé, ce qui indique ainsi l'absence de reconnaissance du domaine intracellulaire des isoformes *Nrg-1* par l'immunsérum.

Nous avons ensuite réalisé une analyse par western blot des extraits protéiques compartimentaux en utilisant un anticorps commercial dirigé contre le domaine extracellulaire (ECD) des isoformes Nrg-2 (*voir paragraphe 3*) et l'anticorps polyclonal original que nous avons produit et dirigé contre le domaine intracellulaire (ICD) de ces mêmes isoformes. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire des isoformes Nrg-2 nous a permis de mettre en évidence un signal de 92 kDa dans les extraits protéiques correspondant à la fraction membranaire et d'un signal de 53 kDa dans les extraits protéiques réalisés à partir de la fraction cytoplasmique (figure 3.2A). Ce signal de 53 kDa correspond vraisemblablement à une forme destinée à être sécrétée tandis que la forme de 92 kDa doit correspondre à une isoforme membranaire. En utilisant cette fois l'anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire des isoformes Nrg-2, nous observons un signal de 48 kDa dans les extraits protéiques réalisés à partir de la fraction membranaire et de la fraction nucléaire des CSN (figure 3.2B).

Ces résultats suggèrent donc que le domaine intracellulaire des isoformes Nrg-2 subit un clivage suivi d'une translocation du domaine intracellulaire dans le noyau comme c'est le cas pour CRD-NRG.

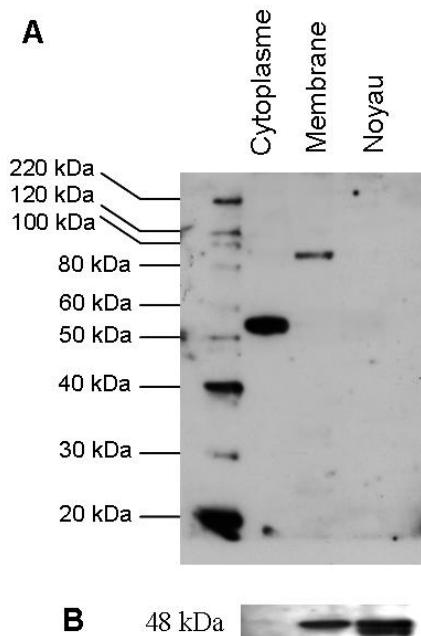


Figure 3.2. Localisation des domaines extra- et intracellulaire de Nrg-2 dans des cellules souches nerveuses en culture. Analyse par western blot réalisée sur les extraits protéiques obtenus à partir des trois compartiments de CSN en culture, soit le cytoplasme, les membranes et le noyau. Après migration électrophorétique et transfert des protéines, la membrane été incubée en présence soit d'un anticorps dirigé contre ECD des isoformes Nrg-2(A) ou contre ICD des isoformes Nrg-2 (B). On observe un signal de 53kDa dans les extraits protéiques provenant de la fraction cytoplasmique et un signal de 92kDa dans les extraits protéiques provenant de la fraction membranaire. Un signal de 48kDa est observé dans extraits protéiques réalisés à partir des fractions nucléaires et membranaires lorsqu'on utilise l'anticorps reconnaissant le domaine ICD de Nrg-2.

2.2 Effet de la modulation de l'expression des Neurégulines-2 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses en culture

Nous avons abordé l'étude du rôle des isoformes codées par *Nrg-2* dans la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses selon la même approche que nous avions utilisée précédemment pour étudier le rôle des isoformes codées par *Nrg-1*, c'est-à-dire que nous avons invalidé l'expression de *Nrg-2* dans des CSN en culture à l'aide de siRNA (*les siRNA dirigés contre l'expression des isoformes Nrg-2 sont décrits au paragraphe 3*). Nous avons d'abord vérifié que la transfection de ces siRNA était efficace pour réprimer l'expression des isoformes Nrg-2. Deux jours après la transfection des CSN en culture en utilisant ces siRNA, nous avons extrait les protéines et nous avons réalisé une analyse par western blot de ces extraits protéiques en utilisant l'anticorps dirigé contre le domaine ECD des isoformes Nrg-2. Par ailleurs, nous avons vérifié à la fois la spécificité d'effets des siRNA dirigés contre l'expression des isoformes Nrg-1 et la spécificité de reconnaissance de cet anticorps dirigé contre le domaine ECD des isoformes Nrg-2 en transfectant les CSN en culture avec les siRNA dirigés contre l'expression des isoformes Nrg-1 (figure 3.3). Dans ces conditions, nous observons bien une diminution spécifique du signal de 53 kDa dans les extraits protéiques préparés à partir des CSN transfectées à l'aide des siRNA dirigés contre l'expression des isoformes Nrg-2, ceci alors que le signal observé à l'aide d'un anticorps anti-actine reste stable par rapport aux conditions contrôles. Par ailleurs, ce signal de 53 kDa n'est pas influencé par une transfection à l'aide de siRNA dirigés contre l'expression des isoformes Nrg-1, les mêmes siRNA que ceux utilisés au chapitre 2.

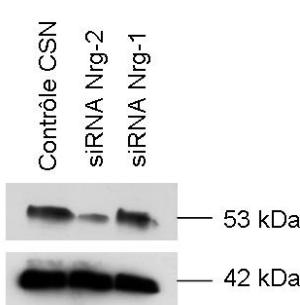


Figure 3.3. Inhibition de l'expression des isoformes codées par *Nrg-2* dans des cultures de cellules souches nerveuses après transfection à l'aide de siRNA. Trois jours après la transfection à l'aide des différents siRNA indiqués, les protéines totales ont été extraites et analysées par western blots à l'aide d'anticorps dirigés contre le domaine ECD des isoformes Nrg-2. Nous avons utilisés comme contrôles des cellules souches nerveuses qui n'ont pas subi de transfection et des cellules transfectées à l'aide d'un siRNA dirigé contre l'expression des isoformes Nrg-1 (voir chapitre II). Après révélation de la membrane de transfert, on observe que le signal diminue dans les extraits protéiques réalisés à partir des cellules transfectées à l'aide des siRNA dirigé spécifiquement contre l'expression des isoformes Nrg-2. Un autre contrôle à la fois de spécificité et de chargement du gel de western blot a consisté à analyser les signaux de 42 kDa observés dans chaque extrait protéique à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'actine.

Trois jours après transfection à l'aide des siRNA spécifiquement dirigés contre l'expression des isoformes Nrg-2, les cellules souches nerveuses de la culture ont été fixées et le niveau de prolifération a été évalué par immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 nous permettant de quantifier ainsi la proportion de cellules en cycle dans la culture. Tout comme au chapitre 2, nous avons quantifié l'effet de la transfection à l'aide des siRNA dirigés contre l'expression des isoformes Nrg-2 en le comparant à celui observé dans des cultures de cellules souches nerveuses soit ne subissant pas les manipulations de transfection (conditions contrôles) soit après transfection à l'aide de siRNA ne reconnaissant aucun transcrit connu chez la souris (conditions non target) ou à l'aide de siRNA dirigés contre l'expression d'une protéine non relevante dans le cas des Neurégulines, à savoir la géphyrine (conditions GPNH). Rappelons que la géphyrine est normalement impliquée dans le *clustering* des récepteurs à la glycine. La quantification de la proportion de cellules Ki67-positives dans ces cultures nous permet d'observer une diminution statistiquement significative du nombre de cellules en cycles dans les cultures caractérisées par une diminution de l'expression des isoformes Nrg-2, ceci par rapport aux cultures des groupes contrôles (figure 3.4A).

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'inhibition de l'expression de *Nrg-2* par les cellules souches nerveuses en culture dans le processus de différenciation. Cinq jours après la transfection réalisée à l'aide des différents siRNA détaillés ci-dessus, des immunomarquages utilisant des anticorps reconnaissant un marqueur spécifique de chaque type cellulaire (anticorps Tuj1 reconnaissant la β III-tubuline pour les neurones, O4 pour les oligodendrocytes et EAAT1 pour les astrocytes) ont été réalisés et les proportions de cellules ont été ensuite comptées dans différents champs microscopiques pris au hasard. La quantification de la proportion de cellules Tuj1-positives (c'est-à-dire neuronales) ne met en évidence aucune différence entre les cultures de cellules souches nerveuses servant de conditions contrôles et le groupe de cellules transfectées à l'aide de siRNA dirigés contre l'expression des isoformes Nrg-2 (figure 3.4B). Par contre la quantification de la proportion de cellules oligodendrogliale, c'est-à-dire O4-positives, montre une diminution lorsqu'on invalide l'expression de Nrg-2 dans les cultures de cellules souches nerveuses (figure 3.4C). Enfin, dans le cas des astrocytes, on n'observe aucun effet de la transfection à l'aide de siRNA ciblant l'expression des isoformes Nrg-2 sur le nombre de cellules EAAT1-positives (figure 3.4D). Ces résultats indiquent donc que les isoformes Nrg-2 exprimées par les cellules souches

nerveuses en culture seraient impliquées à la fois dans la régulation de la prolifération de ces cellules et dans leur différenciation oligodendrogliale. Par ailleurs, en ce qui concerne la différenciation oligodendrogliale des cellules souches nerveuses, ces isoformes Nrg-2 n'agiraient pas via une interaction avec les récepteurs ErbB2 ou ErbB4, puisque l'invalidation de leur expression n'était suivie d'aucun effet sur le nombre d'oligodendrocytes (voir chapitre 2). Comme dans le cas des isoformes encodées par *Nrg-1*, ces observations suggèrent donc que les isoformes codées par *Nrg-2* puissent stimuler la prolifération des cellules souches nerveuses en culture via une interaction de leur domaine extracellulaire ECD avec les récepteurs ErbB4. Par contre, la différenciation oligodendrogliale stimulée par les isoformes codées par *Nrg-2* pourrait être la conséquence d'une action du seul domaine ICD de ces isoformes.

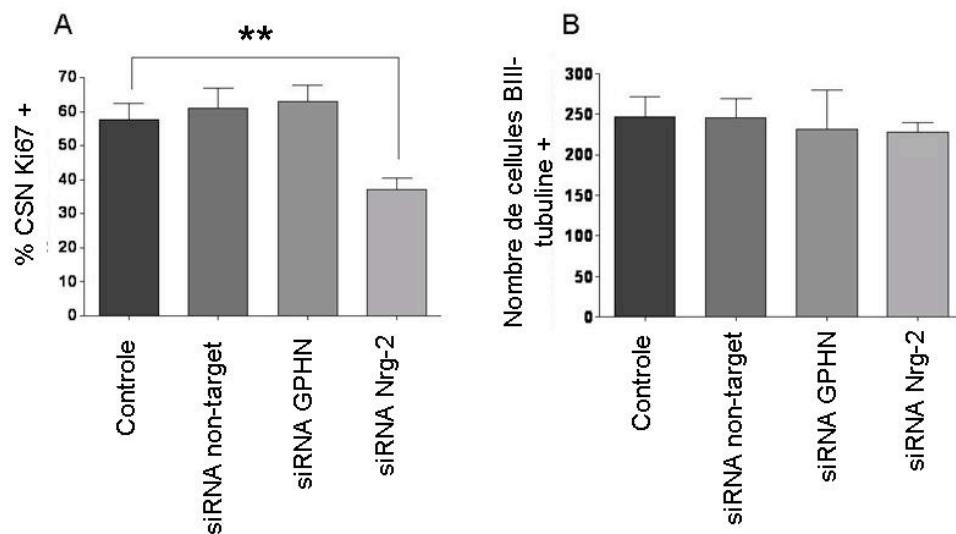


Figure 3.4. Effets de l'inhibition de l'expression des isoformes Nrg-2 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses en culture. (A) L'inhibition de l'expression des isoformes Nrg-2 suite à la transfection de cellules souches nerveuses en culture à l'aide de siRNA provoque une diminution du nombre de cellules souches nerveuses en cycle. Trois jours après la transfection, les cellules ont été fixées à l'aide de paraformaldéhyde et nous avons réalisé un immunomarquage utilisant un anticorps anti-Ki67. La quantification s'est faite au niveau de vingt champs sélectionnés au hasard sur chaque lamelle en comptant deux lamelles par transfection pour un total de huit transfections indépendantes (N=8). Nous avons ensuite compté la proportion de cellules Ki67-positives par rapport au nombre total de cellule quantifié par comptage des noyaux (colorés au DAPI). Pour les études de différenciation, les cellules ont été fixées à l'aide de paraformaldéhyde et utilisées pour différentes études en immunofluorescence cinq jours après la transfection. (B) En utilisant un anticorps dirigé contre la β III-tubuline, nous n'observons aucune variation du nombre de neurones différenciés.

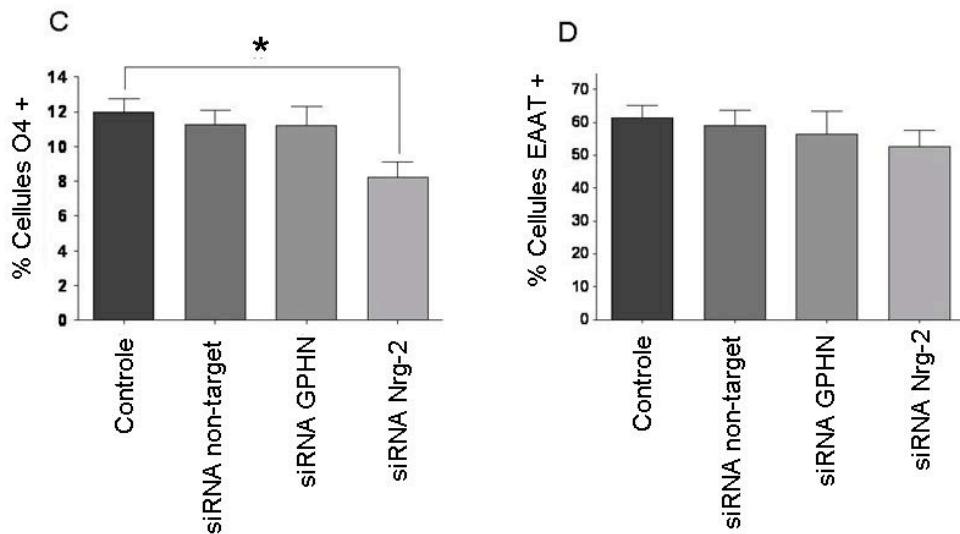
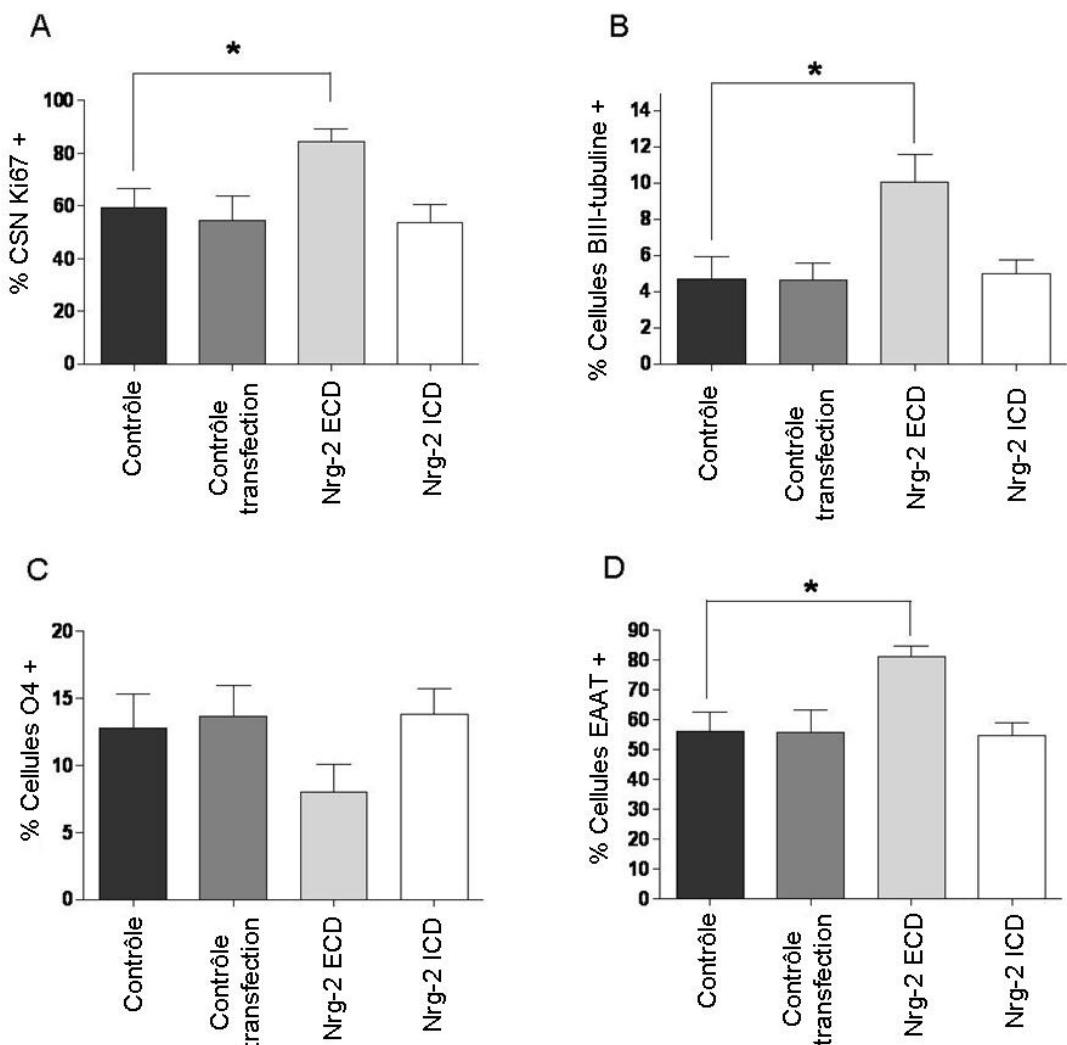


Figure 3.4. Effets de l'inhibition de l'expression des isoformes Nrg-2 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses en culture. La quantification s'est faite au niveau de vingt champs sélectionnés au hasard sur chaque lamelle en comptant deux lamelles par transfection pour un total de huit transfections indépendantes (N=8). (C) Les immunomarquages réalisés à l'aide de l'anticorps O4 révèlent une diminution du nombre d'oligodendrocytes lorsque les CSN sont transfectées à l'aide de siRNA dirigés contre l'expression de *Nrg-2*. (D) En comptabilisant les nombres d'astrocytes à l'aide d'un anticorps anti-EAAT1, aucune modification n'a été observée. Dans le cas du graphe (B), les résultats sont exprimés en nombre total de neurones par lamelles. Dans le cas des graphes (C) et (D), la quantification a été réalisée comme décrite dans le cas de l'immunomarquage anti-Ki67. Nous avons utilisé une analyse statistique Anova 1 suivi d'un post-test de Tukey (* et ** représentent respectivement $p < 0.05$ et $p < 0.01$).

Nous avons ensuite surexprimé les domaines extra- et intracellulaire de Nrg-2 (respectivement ECD et ICD) dans des cultures de cellules souches nerveuses en transfectant ces cellules à l'aide de vecteurs d'expression (*les constructions de ces vecteurs sont décrites au paragraphe 3*). Le taux de prolifération des cellules et leur niveau de différenciation en neurones, oligodendrocytes et astrocytes ont été ensuite quantifiés par comptage des cellules souches nerveuses n'ayant pas subi de transfection ou transfectées à l'aide des différents plasmides. A nouveau, la prolifération a été quantifiée après immunomarquages à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 (trois jours après la transfection) et la quantification de la différenciation a été réalisée après immunomarquages à l'aide d'anticorps Tuj1 ou anti β III-tubuline, anti-O4 et anti-EAAT1 (cinq jours après transfections) pour reconnaître respectivement les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes.

En ce qui concerne le niveau de prolifération, on observe une augmentation statistiquement significative du nombre de cellules souches nerveuses en cycle dans les cultures de CSN surexprimant le domaine extracellulaire des isoformes Nrg-2, ce qui suggère un recrutement et une activation des récepteurs ErbB2 et ErbB4 par Nrg-2 ECD (figure 3.5A).

Lorsque maintenant on quantifie la différenciation des cellules souches nerveuses dans ces conditions, on observe une augmentation statistiquement significative du nombre de neurones et d'astrocytes qui se sont différenciés dans les cultures de cellules souches nerveuses qui surexpriment le domaine Nrg-2 ECD (figure 3.5B-D). Notons cependant que l'inhibition de l'expression des isoformes Nrg-2 dans ces cultures ne provoque pas de diminution du nombre de neurones ou d'astrocytes (figure 3.4B et 3.4D). Par ailleurs, et bien que l'inhibition de l'expression *Nrg-2* induise une diminution du nombre d'oligodendrocytes (figure 4C), la surexpression tant de Nrg-2 ECD que de Nrg-2 ICD n'influence pas de façon significative le nombre d'oligodendrocytes différenciés. Ces résultats suggèrent donc que seul le domaine extracellulaire de Nrg-2 joue un rôle dans la prolifération et la différenciation neuronale et astrogliale des CSN. Il est d'ailleurs possible que ces deux mécanismes soient liés : la stimulation de la division cellulaire induite par les isoformes Nrg-2 est suivie d'une stimulation de différenciation en neurones et/ou en astrocytes dans les cellules filles issues de cette division.



Figures 3.5. Le domaine extracellulaire des isoformes Nrg-2 stimule à la fois sur la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses en culture. Les domaines extra- et intracellulaire de Nrg-2 (respectivement Nrg-2 ECD et Nrg-2 ICD) ont été clonés dans un vecteur d'expression pcDNA3.1/V5/His-TOPO et nous avons transfecté les cellules souches nerveuses en culture à l'aide de ces constructions. (A) La surexpression du domaine extracellulaire provoque une augmentation du nombre de cellules en prolifération (mesurée trois jours après la transfection) ainsi qu'une augmentation du nombre de neurones (B) et d'astrocytes lorsque les cellules sont cultivées pendant cinq jours après la transfection (D). Par contre, on n'observe aucune modification de l'importance de la différenciation oligodendrogliale lorsque les cellules surexpriment soit Nrg-2 ECD ou Nrg-2 ICD, ceci bien qu'une tendance à la diminution du nombre d'oligodendrocytes suit la surexpression de Nrg-2 ECD mais celle-ci n'est pas significative sur le plan statistique (C). Pour la quantification, nous avons sélectionné vingt champs au hasard sur chaque lamelle en comptant deux lamelles par transfection pour un total de quatre transfections indépendantes (N=4). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de cellules quantifié par comptage de noyaux colorés au DAPI. Nous avons utilisé une analyse statistique Anova 1 suivie d'un post-test de Tukey (* représente p< 0.05).

2.3 Interactions protéiques

Nous avions précédemment démontré que le domaine intracellulaire des isoformes Nrg-1 interagissait notamment avec BAF57 et Brm dans les cellules souches nerveuses en culture. Par ailleurs, on observe une grande homologie, voire à certains endroits une identité entre les séquences des domaines intracellulaires des isoformes Nrg-1 et Nrg-2. Nous avons donc recherché si certaines de ces interactions observées dans le cas des isoformes Nrg-1 existaient également avec les isoformes Nrg-2. Cette hypothèse méritait une vérification, ceci d'autant plus qu'un analyse par western blot réalisée à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre le domaine intracellulaire des isoformes Nrg-2 nous a permis d'observer une localisation nucléaire de celui-ci (figure 3.2B). Enfin, une modulation éventuelle de ces interactions pouvait permettre d'expliquer les différences de résultats observées dans les expériences de surexpression ou d'invalidation de l'un et l'autre gène. Ainsi par exemple, l'inhibition de l'expression des isoformes Nrg-2 dans des cultures de CSN est suivie d'une diminution de la différenciation de ces cellules en oligodendrocytes mais n'a aucun effet sur la différenciation neuronale contrairement aux résultats obtenus lorsqu'on inhibe l'expression des isoformes Nrg-1 puisque dans ce cas, on observe une diminution du nombre d'oligodendrocytes **et** de neurones.

Nous avons donc procédé à des expériences d'immunoprécipitations d'extraits protéiques de cellules souches nerveuses en culture à l'aide des anticorps anti Nrg-2 ICD, anti-BAF57, anti-Brg1 et anti-Brm, ceci afin de mettre en évidence une éventuelle interaction de Nrg-2 ICD avec des membres du complexe Swi/Snf. Nous avons ensuite analysé par western blot les protéines immunoprécipitées et ce western blot a été révélé à l'aide de l'anticorps spécifiquement dirigé contre Nrg-2 ICD (figure 3.6). On observe dans ces conditions un signal correspondant au domaine intracellulaire de Nrg-2 dans les protéines immunoprécipitées à l'aide anticorps anti-BAF57 et anti-Brm. En revanche les protéines précipitées à l'aide des anticorps anti-Brg1 ne permettent d'observer sur ce western blot aucun signal correspondant à Nrg-2 ICD. Il semble donc que Nrg-2 ICD puisse interagir avec au moins deux membres du complexe Swi/Snf, de la même façon qu'interagissait Nrg-1 ICD.

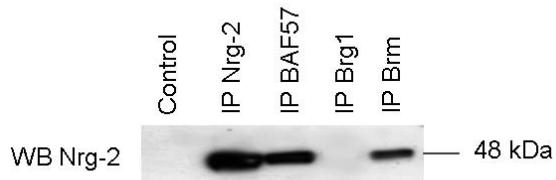


Figure 3.6. Le domaine intracellulaire de Nrg-2 interagit avec BAF57 et Brm dans les cellules souches nerveuses en culture.

Les protéines totales de cellules souches nerveuses en culture ont été extraites et nous avons ensuite procédé à des immunoprécipitations sur ces extraits. Une analyse par western blot réalisée à l'aide d'un anticorps anti-Nrg-2 ICD sur ces protéines immunoprécipitées en utilisant des anticorps anti-BAF57, anti-BRG1, anti-Brm et anti-Nrg-2 permet de mettre en évidence une co-immunoprécipitation de Nrg-2 ICD et BRM ou Nrg-2 ICD et BAF57 mais pas des protéines Nrg-2 ICD et Brg1. Le contrôle négatif consiste en une analyse par western blot de protéines immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps non-relevant, c'est-à-dire des IgG de lapin.

En conclusion de ce chapitre, nous montrons que les cellules souches nerveuses en culture expriment des isoformes transmembranaires codées par *Nrg-2*. Ces isoformes subissent un clivage libérant le domaine intracellulaire ICD qui est ensuite transloqué dans le noyau des cellules. A cet endroit, Nrg-2 ICD peut interagir avec BAF57 et Brm, deux membres du complexe de remodelage chromatinien Swi/Snf. Par ailleurs, nous montrons que les isoformes codées par *Nrg-2* et exprimées par les cellules souches nerveuses en culture sont impliquées dans la régulation de la prolifération de ces cellules et dans leur choix de destin neuronal et astrogial via cependant le domaine extracellulaire. Il existe néanmoins dans le cas des isoformes *Nrg-2* une relative non-concordance entre certains résultats observés dans les expériences d'invalidation par rapport aux résultats observés dans les expériences de surexpression. Ceci suggère donc une régulation sur le plan moléculaire intriquée à une autre régulation ou à des mécanismes de compensation rapide qu'il convient de discuter.

3. Matériel et méthodes

3.1 Anticorps anti-Nrg-2

Les anticorps dirigés contre Nrg-2 ICD, n'existant pas dans le commerce, ont été générés par la firme Eurogentec©. Après avoir repérer les parties non homologues entre Nrg-1 ICD et Nrg-2 ICD et vérifier par un BLAST que les séquences peptidiques ainsi choisies reconnaissaient de manière spécifique Nrg-2 ICD, celle-ci a ensuite été transmises à la société Eurogentec© en vue d'une immunisation de lapins. Ce peptide synthétique (séquences : Tableau 3.1) a alors été couplé au complexe KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) afin d'assurer son transport et sa non-dégradation dans le sang. Les hémocyanines sont des transporteurs d'oxygène utilisant le cuivre. Elles sont largement utilisées comme protéines de transport dans la production d'anticorps à cause du grand caractère immunogénique qu'elles confèrent à l'antigène qu'elles transportent.

Séquence des peptides synthétiques	
Nrg-1 ICD	FRLAE SRTNP AGRFS T
Nrg-2 ICD	WSLER SESLT SDSQS G

Tableau 3.1 : Séquences du peptide synthétique utilisé pour l'immunisation de lapins en vue de l'obtention d'anticorps dirigés contre la partie intracellulaire (ICD) de Nrg-2. La séquence correspondante de Nrg-1 est indiquée pour information. Il a été synthétisé par Eurogentec et nous a servi pour nous assurer de la spécificité de l'anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire de Nrg-2.

Pour les analyses par western blot, nous avons donc utilisé un anticorps reconnaissant un épitope situé sur le domaine extracellulaire et un anticorps dont l'épitope reconnu est localisé sur le domaine intracellulaire (tableau 3.2).

	Isotype	Dilution	Provenance
Nrg-2 ECD	Lapin	1/500	Santa Cruz©, Heidelberg, Germany
Nrg-2 ICD	Lapin	1/100	Eurogentec©, Liège, Belgique

Tableau 3.2 : Anticorps primaires dirigés contre Nrg-2 et utilisés dans le cas des analyses par western blot.

3.2 Dot-Blot

Les différents échantillons protéiques sont ajustés par rapport à leur concentration dans un volume final de 15µl. On ajoute ensuite 5µl de tampon de chargement 4x concentré (tampon de chargement : Tris HCl 106mM, Tris base 141mM, LDS 2%, Glycérol 10%, EDTA 0,51mM, SERVA Blue G250 0,22mM, rouge de Phénol 0,175mM, pH 8,5) à chaque échantillon. Après dénaturation à 70°C pendant 10 minutes, 5 ou 10µl

de la solution sont déposés directement sur une membrane PVDF (Roche©), rendue hydrophile par des passages successifs dans du méthanol, de l'eau et du tampon de transfert (Bicine 50mM, Tris base 50mM et SDS 0,1%, pH 8,24). Une fois que l'échantillon est absorbé par la membrane et a séché à température ambiante, la membrane est lavée dans le tampon de transfert afin d'éliminer le surplus de tampon de chargement. Les sites non spécifiques de fixation protéique de la membrane sont alors saturés en incubant celle-ci dans un tampon de blocage (0,2% I-Block – caséine purifiée (Tropix©, Bedford, MA, USA) dans du TBS-Tween) pendant 1 heure. Le TBS-Tween est composé de Tris 50mM, NaCl 120mM et Tween 0,2%, pH 7,6. La membrane est ensuite incubée dans la solution bloquante contenant les anticorps primaires dirigés contre le domaine intracellulaire de Nrg-2 (dilué à 1/200) pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation douce. Après trois rinçages de 15 minutes dans du TBS-Tween, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante dans le tampon de blocage contenant l'anticorps secondaire (dilutions 1/3000) couplé à la peroxydase, toujours sous agitation. Enfin, après trois nouveaux rinçages, la membrane est incubée dans la solution de substrat chemoluminescent, Supersignal West Pico (Pierce©, Rockford, IL) pendant 1 minute, puis exposée en autoradiographie.

3.3 RNA interférence

Les siRNA dirigés contre l'expression de *Nrg2* sont synthétisés par la firme Ambion© (Cambridgeshire, United kingdom). La séquence des siRNA est déterminée par l'utilisation d'un algorithme développé par Cenix BioScience© (Dresden, Germany). Les séquences cibles des exons de ces trois gènes ont été déterminées et localisées à l'aide du *nucleotide-nucleotide* BLAST du NCBI. Ces différents siRNA sont utilisés pour la transfection à une concentration de 200nM.

	Sens	Antisens
siRNA Nrg2	GCCAAGUCCUAUUGCUCUCA	UGACGCAAUAGGACUUGGC

Tableau 3.3 : séquences des siRNA dirigés contre *Nrg-2*.

3.4 Construction des vecteurs d'expression pour les domaines extra- et intracellulaires de Nrg-2

La méthodologie utilisée pour la construction des plasmides étant quasiment identique à celle mise en œuvre pour les constructions réalisées dans le cas des domaines de Nrg-1, nous décrirons uniquement les changements par rapport à la section matériel et méthodes de l'annexe 2.

3.4.1 Extraction d'ARN totaux à partir de cervelet de souris

Après dissection, le cervelet de souris jeunes (P7) (souche NMRI) est homogénéisé dans 1ml de TRIzol (Invitrogen©) à l'aide d'un potter. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante afin de permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques, on ajoute 200µl de chloroforme. Le mélange est agité vigoureusement pendant 15 secondes, laissé 15 minutes à température ambiante et enfin centrifugé à 12 000g pendant 15 minutes (4°C). Cette centrifugation permet une dissociation en trois phases : une phase incolore contenant les ARN, une phase intermédiaire correspondant à l'ADN et une phase rosée contenant les protéines. La phase incolore est alors transférée dans un nouveau tube, 500µl d'isopropanol sont ajoutés et après un repos de 10 minutes à température ambiante, le tout est centrifugé à 12 000g pendant 10 minutes (4°C). Après élimination du surnageant, l'ARN précipité subit un rinçage à l'aide d'éthanol 75%. Une dernière centrifugation de 5 minutes à 6 000g (4°C) est réalisée et le surnageant éliminé. Enfin, l'ARN est séché à l'air avant de le resuspendre dans 30µl d'eau traitée au diéthyl-pyrocaramate (DEPC) afin d'inhiber les RNases contaminantes et ce, de façon définitive. Pour les besoins du dosage, 2 µl de la solution sont dilués dans 98µl d'eau traitée au DEPC et l'absorbance est lue à l'aide d'un spectrophotomètre à 260 et à 280nm (Gene Quant Pro, GE Healthcare©).

3.4.2 Amplification des séquences Nrg-2 ECD et ICD par RT-PCR.

La transcription inverse, la méthode de PCR et le clonage dans le vecteur d'expression ont été réalisés de manière identique à ce qui est décrit au chapitre 2. Nous nous limiterons donc à fournir la séquence des amorces utilisées dans ce cas (tableau 3.4) et au protocole d'amplification suivi pour la partie extracellulaire et intracellulaire de *Nrg-2*.

Amorce	Séquence
--------	----------

Nrg-2 ICD sens	5'-CAC-CAT-CAT-CAT-CTC-CGG-CAG-AAC-3'
Nrg-2 ICD antisens	5'-TGC-GCT-CCT-TTT-CCC-TCT-CCA-GT-3'
Nrg-2 ECD sens	5'-CAC-CTG-TGT-CAC-TCG-CCT-GCT-ACT-3'
Nrg-2 ECD antisens	5'-TGC-GGT-ACA-GCT-CCT-CAG-CCT-TG-3'

Tableau 3.4 : séquences des amorces Nrg-2 ICD et Nrg-2 ECD utilisées pour les réactions de PCR

Les oligonucléotides synthétiques utilisés sont synthétisés chez Eurogentec© (Liège, Belgique).

Insert	Dénaturation initiale	Cycles de dénaturation+ hybridation + elongation	Elongation finale
Nrg-2 ICD	95°C pendant 2 minutes	30 cycles de -30 secondes à 95°C -1 minute à 59°C -1 minute à 72°C	8 minutes à 72°C
Nrg-2 ECD	94°C pendant 2 minutes	30 cycles de -30 secondes à 94°C -1 minute à 57°C -1 minute 30 à 72°C	8 minutes à 72°C

Tableau 3.5: Paramètres d'amplification utilisés pour les fragments Nrg-2-ICD et Nrg-2 ECD.

Chapitre IV

Discussion.

Après une lésion du système nerveux, les capacités de régénération cellulaire chez un individu adulte sont extrêmement réduites : tout au plus, on peut assister à une remyélinisation limitée chez l'homme (Dubois-Dalcq et al., 2008), alors que la recroissance axonale est quasi inexistante (Cui, 2006). Par ailleurs, la néo-formation de neurones en réponse à une lésion n'est jamais observée (Moyse et al., 2008). Dès lors, les mécanismes à la base de la récupération fonctionnelle d'un patient après lésion, et ceci quelle que soit la nature de celle-ci, sont uniquement basés sur la plasticité du système nerveux (Sale et al., 2009) qui inclut principalement une modulation fine du fonctionnement synaptique, modulation proche des mécanismes actuellement connus pour être impliqués dans l'apprentissage (Lee et Silva, 2009). Dans ce contexte, il n'est dès lors pas étonnant d'observer une meilleure récupération fonctionnelle chez l'individu jeune par rapport à l'individu plus âgé.

Cette situation classiquement attribuée au prix payé à l'évolution par les mammifères en général et par l'espèce humaine en particulier (Tanaka et Ferretti, 2008), s'est trouvée récemment au cœur d'un paradoxe non encore résolu lorsqu'on a démontré qu'une neurogenèse persistait chez l'adulte dans l'espèce humaine, notamment au sein de la zone sous-ventriculaire et du gyrus denté (Eisch et al., 2008 ; Breunig, et al., 2008). De plus, on a mis en évidence diverses situations capables de moduler de manière extrinsèque cette neurogenèse adulte y compris chez l'homme (Mehler, 2008). Le système nerveux dispose donc d'un potentiel d'auto-réparation mais l'absence d'une néo-formation accrue de neurones observée après lésion incite à penser que ce potentiel reste non-recruté et donc inefficace.

Il semble cependant que les cellules souches nerveuses restent recrutables suite à une lésion du système nerveux central. Ainsi, l'injection intra-ventriculaire d'EGF ou de HB-EGF après une lésion ischémique stimule la prolifération des cellules souches de la zone sous-ventriculaire et diminue la taille de l'infarctus (Teramoto et al., 2003 ; Jin et al., 2004). Par ailleurs, l'injection de ces facteurs en l'absence de lésion préalable est sans effets sur les cellules souches nerveuses chez l'animal adulte. Ceci amène deux conclusions : 1) les cellules souches nerveuses de l'adulte restent capables de répondre à des stimuli extrinsèques lorsque ceux-ci sont présents ; 2) leur capacité de réponse à ces stimuli extrinsèques dépend de la présence d'une lésion préalable (et/ou d'un état inflammatoire). De plus, il est frappant de constater que les cellules souches nerveuses adultes sont ici recrutées par un ou des ligands appartenant à une famille de facteurs de croissance jouant un grand rôle au cours du développement (Birchmeier, 2009),

facteurs auxquels elles ne semblent plus capables de répondre à l'âge adulte et en l'absence de lésion.

Ces quelques considérations soulignent à nos yeux le bien-fondé de ce travail : étudier la régulation moléculaire de la prolifération et de la différenciation des cellules souches nerveuses au cours du développement, de manière à pouvoir peut-être à terme recruter l'un ou l'autre de ces modes de régulation chez l'individu adulte, de manière à favoriser une régénération cellulaire, voire tissulaire après lésion.

Nous avons rappelé que de nombreux facteurs de transcriptions et signaux extracellulaires interagissent au cours de la neuro-ontogenèse afin de réguler la prolifération et la différenciation des cellules souches nerveuses et nous nous sommes attardés à décrire quelques uns de ceux-ci de manière succincte. Toutefois, notre travail expérimental s'est focalisé sur une famille de facteurs de croissance, ou plus exactement sur quelques membres de cette famille dont les isoformes sont codées par *Nrg-1* et *Nrg-2*. Chez l'homme et la souris, le gène *Nrg-1* est caractérisé par le nombre important d'isoformes pour lesquelles il code (Mei et Xiong, 2008). La variabilité d'isoformes codées par *Nrg-1* résulte d'un épissage alternatif et de la présence de plusieurs promoteurs. Cette grande diversité d'isoformes de *Nrg-1* explique évidemment la variété des rôles biologiques qu'on lui attribue : la différenciation neuronale (Villegas et al., 2000), la migration neuronale (Rio et al., 1997), la myélinisation (Rogister et al., 1999 ; Nave et Salzer, 2006), le développement et la différenciation des cellules gliales (Garratt et al., 2000), la régulation de la transcription (Schaeffer et al., 2001), la formation de synapses et la modulation de la transmission (Wolpowitz et al., 2000). Par ailleurs, outre ces rôles dans le développement proprement dit, différentes isoformes de *Nrg-1* jouent un rôle dans la maturation du système nerveux associée à une réorganisation tissulaire comme le contrôle hypothalamique du déclenchement de la puberté par exemple (Prévote et al., 2003). Il n'est donc pas étonnant dans ce contexte qu'on ait recherché un rôle pour ou l'autre isoforme comme agent neuroprotecteur après une ischémie (Guo et al., 2006).

Pour toutes ces raisons, *Nrg-1* nous semblait dès lors un bon candidat comme facteur de croissance ayant un rôle à la fois important dans le développement et qui aurait pu à nouveau se manifester chez l'adulte en cas de lésion. Par ailleurs, nous avions précédemment démontré que les cellules souches nerveuses en culture exprimaient préférentiellement les Neurégulines-1 de type III ou CRD-NRG et les récepteurs ErbB2 et ErbB4 (Calaora et al., 2001). En outre, une stimulation de ces

cellules en culture par une forme soluble du récepteur ErbB3 (afin d'inhiber l'interaction des isoformes avec leur récepteur) provoquait une diminution de nombre de cellules souches nerveuses en prolifération et par ailleurs une augmentation de la différenciation en oligodendrocytes des cellules souches survivantes. Encore une fois, nous étions face au caractère multiple des rôles dévolus aux Neurégulines, bien que dans ce cas, on ne puisse exclure que la forme soluble recombinante du récepteur ne puisse interagir avec d'autres ligands de la famille EGF.

Il est étonnant de constater que ce qui distingue CRD-NRG dans la famille des ligands EGF est l'existence de deux domaines transmembranaires (Dreux, et al., 2006). Dès lors, le clivage juxtamembranaire du côté du feuillet extracellulaire (shedding), entre le domaine transmembranaire et le domaine EGF, abouti à une situation propre à CRD-NRG, à savoir que les deux peptides générés par le clivage restent ancrés dans la membrane (figure 4.1).

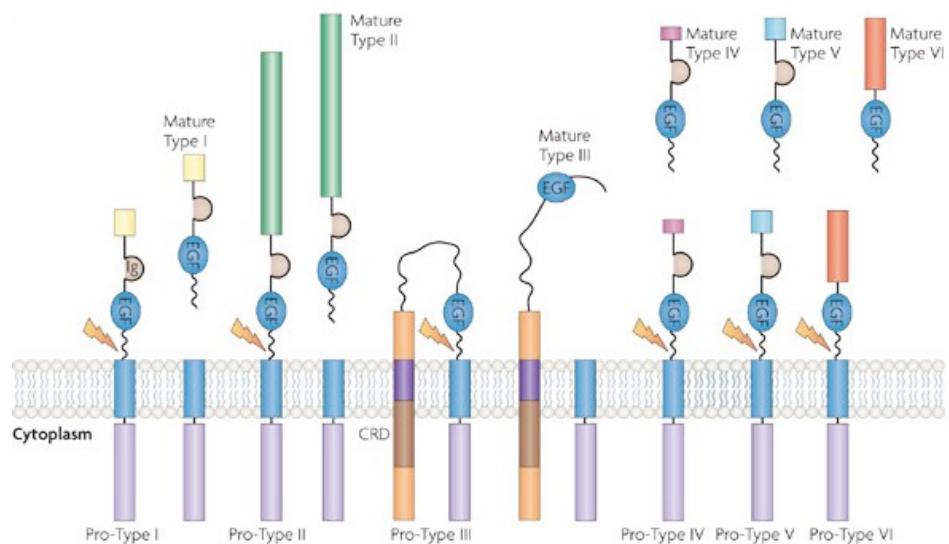


Figure 4.1. Représentation schématique du clivage juxtamembranaire dans les différentes isoformes de Neurégulines-1. La plupart des Neurégulines-1 sont synthétisées sous forme d'un précurseur transmembranaire dont le motif EGF est localisé dans le domaine extracellulaire. Le clivage par une métalloprotéase génère des peptides solubles, excepté dans le cas des Nrg-1 de type III qui restent ancrées dans la membrane. Figure adaptée de Mei and Xhiong, 2008.

En d'autres termes, le clivage de tous les ligands présents sous la forme de « précurseur membranaire » permet une diffusion du ligand qui agira de manière juxtacrine, voire à distance, tandis que dans le cas de CRD-NRG, ce clivage générera un ligand portant le domaine EGF qui reste ancré dans la membrane et donc uniquement capable de d'agir sur la cellule voisine. Ceci fait donc de CRD-NRG un candidat idéal pour une signalisation rencontrée de manière spécifique au cours du développement, à

savoir l'inhibition latérale. Pour rappel, au cours de ce mécanisme, une cellule empêche sa ou ses voisine(s) soit d'adopter le même destin qu'elle même soit encore de réaliser un événement cellulaire important comme par exemple une mitose. Ce mécanisme a été décrit pour la première fois chez la drosophile dans le cas du système Notch (Chitnis, 1995).

C'est la raison pour laquelle nous avons rapidement imaginé l'existence d'un mécanisme proche de l'inhibition latérale dans le cas de CRD-NRG. En effet, après clivage membranaire de CRD-NRG, le domaine EGF présent sur la partie N-terminale restait disponible pour une interaction avec les récepteurs ErbB2 et ErbB4 de la cellule voisine et donc, stimulait la survie voire la prolifération de celle-ci, tandis que la partie C-terminale de la protéine pouvait jouer un autre rôle. Dans le cas des cellules souches nerveuses, cet autre rôle pouvait être celui de favoriser l'adoption d'un destin oligodendroglial. Pour être vérifiée, cette hypothèse nécessitait cependant diverses démonstrations : 1) la partie cytoplasmique devait d'une manière ou d'une autre être libérée de la membrane plasmique ; 2) en poursuivant l'analogie avec le système Notch, cette partie C-terminale devait être transloquée dans le noyau et là, y moduler l'expression de gènes ; 3) la conséquence de cette translocation est un effet sur la différenciation ou sur le choix de destin cellulaire.

1. La démonstration d'une translocation nucléaire.

Rappelons que le clivage de Notch est établit en plusieurs étapes (LaVoie et Selkoe, 2003) faisant notamment intervenir la métalloprotéase TACE/ADAM17 réalisant le shedding et une γ -sécrétase réalisant une protéolyse intramembranaire. Avant de rechercher si un tel clivage existe, nous avons d'abord cherché à démontrer une translocation nucléaire du domaine C-terminal de CRD-NRG. Par ailleurs, puisque nous pensions que cette éventuelle translocation pouvait jouer un rôle dans la différenciation des cellules souches nerveuses, nous avons étudié la localisation des domaines extra- et intracellulaire de CRD-NRG non seulement dans des cellules souches nerveuses mais également dans les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes cultivés après purification cellulaire. En utilisant des anticorps spécifiques des deux domaines, nous montrons que des formes transmembranaires codées par *Nrg-1* sont bien présentes dans les membranes des différents types cellulaires. Par ailleurs, nous retrouvons également une forme sécrétée dans le cytoplasme de ces différents types cellulaires. Cependant, notre résultat le plus original fût la démonstration que

dans les différents types cellulaires en culture, le domaine intracellulaire était présent dans les fractions membranaires et nucléaires sous une forme de poids moléculaire compatible avec un clivage. Ce résultat original dans le cas de cellules en culture n'était toutefois pas neuf dans le sens où Bao et coll. avaient démontré la présence de la partie C-terminale des isoformes *Nrg-1* dans le noyau de neurones (Bao et al., 2003).

Bien que les isoformes codées par *Nrg-2* n'aient qu'un seul domaine transmembranaire mais étant donné que la partie C-terminale de ces isoformes est homologue de la partie C-terminale des isoformes *Nrg-1*, nous avons également cherché à savoir si ces isoformes sont présentes dans les cellules souches nerveuses et si le domaine C-terminal intracellulaire des formes transmembranaires subissait aussi, après un éventuel clivage, une translocation nucléaire. En utilisant notamment un anticorps dont la caractérisation complète est actuellement en cours (mais dont par ailleurs, nous sommes sûrs de la spécificité), nous observons que les cellules souches nerveuses en culture expriment une forme transmembranaire complète de 92 kDa, ainsi qu'une forme cytoplasmique (et destinée sans doute à la sécrétion) de 53 kDa et enfin, une forme C-terminale membranaire et nucléaire. Ces résultats concernant le clivage éventuel des isoformes codées par *Nrg-2* et l'adressage spécifique des peptides ainsi générés sont tout à fait originaux. Il convient néanmoins de les compléter par une analyse similaire pour les autres types cellulaires, c'est-à-dire les oligodendrocytes, les neurones et les astrocytes.

On a récemment démontré que le clivage des isoformes codées par *Nrg-1* est également réalisé par la métalloprotéase TACE/ADAM17 ou par ADAM19 (Yokozeki et al., 2007) au niveau de la région dite « *stalk* », c'est-à-dire la région hypervariable située entre le domaine EGF extracellulaire et le domaine transmembranaire (Wang et al., 2001). Par ailleurs, on a également démontré que le domaine intracellulaire est clivé à partir de la forme transmembranaire par protéolyse intramembranaire régulée ou RIP (*Regulated Intramembrane Proteolysis*) suite à l'activité γ -secrétase des présénilines (Landman et Kim, 2004). A ce propos, il est intéressant de noter que des études réalisées chez la souris invalidée pour le gène *PS-1* (*Préséniline-1*) montrent que celle-ci joue un rôle prépondérant dans la neurogenèse et la survie neuronale au cours du développement (Shen et al., 1997). L'activité γ -secrétase des présénilines pourrait donc contrôler la différenciation neuronale en modulant la signalisation Notch mais aussi *Nrg-1*. Enfin, à notre connaissance, aucune donnée n'est actuellement disponible à propos d'un clivage juxta- ou intramembranaire des isoformes *Nrg-2*.

2. La partie intracellulaire de CRD-NRG est capable de moduler la différenciation des cellules souches nerveuses.

Afin de démontrer un éventuel effet de la partie intracellulaire de CRD-NRG sur la prolifération, la survie et/ou la différenciation, nous avons choisi de moduler son expression par les cellules souches nerveuses en culture en inhibant de manière spécifique son expression à l'aide de siRNA mais aussi dans un second temps en stimulant son expression par transfection des cellules. Afin d'être complet, un approche similaire a également été réalisée dans le cas de *Nrg-2*. Enfin, dans cette partie de notre travail il était également justifié d'envisager l'inhibition de l'expression des récepteurs *ErbB2* et *ErbB4*, ceci afin de pouvoir distinguer les effets éventuels qui seraient spécifiquement liés à l'invalidation de la partie C-terminale de CRD-NRG, puisque l'invalidation de la partie N-terminale devait reproduire les effets de l'invalidation des deux récepteurs ErbB. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de l'expression de *Nrg-1* ou de *Nrg-2* est suivie par une diminution du nombre de cellules souches nerveuses en prolifération. Cette diminution est également constatée lors de l'inhibition de l'expression de *ErbB2* et surtout de *ErbB4*. Il a d'ailleurs été démontré qu'au cours du développement, la voie de signalisation *Nrg-1/ErbB4* était impliquée dans la prolifération de cellules souches nerveuses en culture (Lai et Feng, 2004). Ceci suppose qu'un signal de prolifération est bien médié par les récepteurs ErbB après interaction avec une isoforme *Nrg-1* ou *Nrg-2*. Néanmoins, l'inhibition de l'expression de l'un ou l'autre gène n'entraîne pas une diminution comparable à celle observée dans le cas de l'inhibition de l'expression des récepteurs ErbB suggérant soit que *Nrg-2* compense en partie *Nrg-1* lorsque l'expression de ce dernier est inhibée et vice-et-versa, soit encore que d'autres ligands tels que l'amphiréguline, la betacelluline ou encore l'épiréguline peuvent éventuellement jouer un rôle. On sait ainsi que l'amphireguline stimule la prolifération des cellules souches nerveuses (Falk et Frisen, 2002) sans qu'on sache actuellement si ces cellules sont capables d'exprimer ce facteur lorsqu'elles sont cultivées.

Par ailleurs, nous n'avons observé aucun effet de l'inhibition des deux récepteurs ErbB sur la différenciation des cellules souches nerveuses en neurones, en oligodendrocytes ou en astrocytes. Par contre, nous observons une diminution significative du nombre de neurones et d'oligodendrocytes lorsque les cellules sont invalidées pour *Nrg-1* tandis que l'invalidation de *Nrg-2* ne provoque qu'une

diminution significative du nombre d'oligodendrocytes. Concernant la différenciation, on peut déjà tirer deux conclusions importantes de ces observations :

- 1) l'effet de l'inhibition de l'expression de *Nrg-1* et de *Nrg-2* sur la différenciation des cellules souches nerveuses ne s'observant pas dans le cas de l'invalidation des gènes *ErbB2* et *ErbB4*, il faut donc conclure que cet effet est dépendant de la présence de la partie C-terminale des isoformes normalement codées par les deux gènes.
- 2) Bien que les parties C-terminales des isoformes codées par *Nrg-1* et *Nrg-2* soient homologues, les différences de séquence et de structure sont cependant suffisantes pour observer des effets spécifiques sur la différenciation des cellules souches nerveuses.

Dans ce type d'approche expérimentale, il convient toujours de rester prudent et de vérifier les premiers résultats en « renversant » le mode de modulation, c'est-à-dire dans ce cas, en provoquant une surexpression. Par ailleurs, cette approche de surexpression nous permettait d'envisager une surexpression spécifique soit de la partie N-terminale extracellulaire soit de la partie C-terminale intracellulaire pour les deux gènes. Tout d'abord, dans le cas de la surexpression du domaine extracellulaire codé par *Nrg-1*, nous n'observons aucun effet sur la prolifération des cellules souches nerveuses ou encore sur leur différenciation. L'absence d'effet sur la prolifération peut très bien s'expliquer par le fait qu'en temps normal, la prolifération induite par ce facteur via les récepteurs *ErbB2* et *ErbB4* est déjà maximale dans les conditions de la culture. Dès lors la surexpression sera dans ce cas dénuée d'effets. Par ailleurs, l'absence d'effets sur la différenciation après surexpression du domaine extracellulaire confirme la conclusion précédemment émise, à savoir que l'effet des isoformes codées par *Nrg-1* sur la différenciation dépend de la partie intracellulaire C-terminale et non pas de la partie extracellulaire N-terminale des facteurs de croissance.

Lorsqu'on surexprime le domaine intracellulaire des isoformes codées par *Nrg-1*, d'une part on diminue la prolifération cellulaire et d'autre part, on observe une stimulation de la différenciation neuronale et oligodendrogliale. La diminution de prolifération peut être expliquée par le fait qu'une partie des cellules souches nerveuses est en train de se différencier en types cellulaires peu ou pas proliférants. Par ailleurs, il s'agit bien d'une différenciation car, outre le fait que le taux d'apoptose ne se modifie pas dans la culture de cellules souches nerveuses que celles-ci surexpriment ou non le

domaine intracellulaire des isoformes codées par *Nrg-1*, on observe dans le même temps une diminution du nombre de cellules souches nerveuses immatures. Cependant, la localisation nucléaire du domaine intracellulaire dans tous les types cellulaires y compris les astrocytes indique que sa présence à ce niveau n'est pas suffisante pour expliquer la différenciation en neurones ou en oligodendrocytes : sans doute faut-il à la fois une localisation nucléaire et un autre phénomène au niveau moléculaire pour expliquer les effets de l'invalidation de l'expression de *Nrg-1* et les effets de la surexpression du domaine intracellulaire de ses isoformes.

L'analyse des résultats de surexpression des domaines intra- et extracellulaires des isoformes *Nrg-2* est cependant moins aisée. Lorsqu'on surexprime le domaine intracellulaire des isoformes codées par *Nrg-2*, on observe aucun effet tant sur la prolifération que sur la différenciation cellulaire. Puisque la construction plasmidique a été vérifiée par séquençage, cette observation pourrait signifier que la transfection n'a pas fonctionné. Notons cependant, qu'un contrôle interne par transfection avec un plasmide EGFP nous permet de vérifier la validité de la solution de lipides cationiques utilisée. Il faut donc conclure que la partie intracellulaire des isoformes codées par *Nrg-2* n'a pas d'effets ni sur la prolifération ni sur la différenciation cellulaire. Rappelons que nous avions envisagé au départ l'hypothèse d'une signalisation bidirectionnelle dans le cas de CRD-NRG, l'isoforme exprimée par *Nrg-1* dans le cas des cellules souches nerveuses, d'une part sur la base des observations préalables (Calaora et al., 2001) et d'autre part étant donné que c'est le seul ligand de la famille EGF à possédé deux domaines transmembranaires. Autrement dit, ce dernier critère ne s'applique pas aux isoformes codées par *Nrg-2*. Dès lors l'absence d'effet sur la prolifération ou la différenciation des cellules souches nerveuses de la part de la partie C-terminale des isoformes codées par *Nrg-2* conforte donc de manière indirecte et circonstancielle l'hypothèse de départ.

Nous avons mentionné ci-dessus que l'approche expérimentale d'invalidation demandait toujours une confirmation par « l'approche inverse ». Cet aphorisme se vérifie dans le cas de l'expression des domaines extracellulaires des isoformes codées par *Nrg-2* : lorsque l'on surexprime le domaine N-terminal extracellulaire des isoformes codées par *Nrg-2*, on observe une augmentation de la prolifération des cellules souches nerveuses. Ceci tendrait à suggérer le domaine extracellulaire des isoformes *Nrg-2* semble plus efficace pour stimuler la prolifération des cellules souches nerveuses en culture que le domaine extracellulaire des isoformes *Nrg-1*, ceci pour autant que le

niveau de transfection soit comparable dans les deux cas. Par ailleurs, de manière un peu inattendue, la surexpression de ce domaine provoque une augmentation de la différenciation neuronale et astrogliale. Il est clair ici que cet effet de différenciation doit être lié à une interaction de ce domaine avec les récepteurs ErbB2 et ErbB4. L'absence d'effets de l'invalidation de l'expression de *Nrg-2*, de *ErbB2* et de *ErbB4* sur la différenciation peut par ailleurs s'expliquer par le fait que cette voie *Nrg-2/Erb2(4)* ne serait pas la seule susceptible d'aboutir à une différenciation neuronale et astrogliale. D'autre part, il a déjà été démontré que les récepteurs ErbB2 et ErbB4 étaient impliqués dans la différenciation astrogliale (Schmid et al., 2003 ; Sardi et al., 2006). En revanche, à notre connaissance il n'existe pas actuellement de démonstration d'une implication formelle de ces deux récepteurs dans l'acquisition d'un destin neuronal. Rappelons par ailleurs que le récepteur ErbB4 existe sous quatre isoformes possibles suite à un épissage alternatif (Elenius et al., 1999 ; Kainulainen et al., 2000), que la signalisation intracellulaire induite par ces quatres isoformes n'est pas identique et que cet aspect pourrait jouer un rôle dans la biologie neuronale au cours du développement. Ainsi, seule la forme ErbB4 capable de recruter la PI3K joue un rôle dans la stimulation de la migration neuronale (Gambarotta et al., 2004). Il conviendrait donc ici d'analyser l'isoforme ErbB4 exprimée par les cellules souches nerveuses afin d'avoir une idée sur les voies de signalisation secondaires qui seraient recrutées. Ces données ne sont pas anodines à nos yeux par ailleurs. Elles pourraient en effet expliquer la raison à la fois de la plus grande sensibilité de ErbB4 à une stimulation par une isoforme extracellulaire *Nrg-2* par rapport à une isoforme extracellulaire *Nrg-1* en termes de prolifération. Elles pourraient aussi rendre compte de la capacité de l'isoforme extracellulaire *Nrg-2* à stimuler la différenciation neuronale et astrogliale à l'inverse de la forme extracellulaire *Nrg-1*.

Il persiste néanmoins un paradoxe entre deux observations : l'inhibition de l'expression de *Nrg-2* provoque une diminution de la différenciation oligodendrogliale. En revanche la surexpression tant du domaine extracellulaire que celle du domaine intracellulaire de *Nrg-2* sont incapables de stimuler la différenciation oligodendrogliale. Ceci pourrait vouloir signifier que l'expression de *Nrg-2* est nécessaire mais non suffisante pour observer une différenciation oligodendrogliale. Il conviendra néanmoins de vérifier ce point par exemple en surexprimant le domaine intracellulaire des isoformes *Nrg-1* et en inhibant l'expression endogène de *Nrg-2*.

3. La translocation de la partie intracellulaire de CRD-NRG est capable de moduler l'expression de gènes.

La troisième condition à remplir pour affirmer que l'isoforme CRD-NRG est douée d'une signalisation bi-directionnelle au cours du développement du système nerveux concerne la modulation de l'expression de gènes par le domaine intracellulaire de cette isoforme. Etant donné qu'en dehors d'un site de localisation nucléaire, l'analyse de la séquence du domaine intracellulaire de CRD-NRG ne révèle pas de motifs rencontrés dans les diverses familles de facteurs de transcription, nous avons postulé que l'éventuelle modulation de l'expression de gènes qui serait induite par ce domaine intracellulaire serait la conséquence d'interactions protéiques. On avait démontré précédemment que le domaine intracellulaire pouvait interagir avec LIMK1, une kinase cytoplasmique ayant la particularité d'avoir un domaine LIM et capable de phosphoryler la cofilin, une protéine de coiffe des filaments d'actine (Wang et al., 1998). Cette interaction a été mise en évidence dans une expérience de double-hybridre en levure en utilisant une banque de cDNA de cerveau de souris âgées de trois semaines. *In situ*, il a été démontré que le domaine intracellulaire de Nrg-1 co-localisait avec la LIMK1 au niveau des jonctions neuromusculaires indiquant un rôle de cette interaction dans la formation et la maintenance de synapses (Rimer, 2007). Mais cette co-localisation est observée au niveau du cytoplasme et non du noyau. Plus récemment, Bao et al. ont montré une interaction entre le domaine intracellulaire de Nrg-1 et la protéine Eos, un membre de la famille *ikaros* qui sont des facteurs de transcription à doigts de zinc (Bao et al., 2004). Cette interaction détectée uniquement au niveau de la cochlée module l'expression de PSD-95, une protéine synaptique.

Etant donné que nous ne pensions pas que ces résultats précédents nous renseigneraient sur une interaction capable de moduler des gènes impliqués au cours d'étapes précoce de neuro-développement, nous avons repris l'approche de double-hybridre en levure en utilisant cette fois une banque de cDNA de cerveaux d'embryons de souris. Cette approche nous a permis d'identifier une interaction avec la protéine BAF57, un membre du complexe de remodelage chromatinien Swi/Snf. Ce résultat a par ailleurs été confirmé par co-immunoprecipitations sur des extraits protéiques réalisés à partir de cellules souches nerveuses et par TAP-Tag réalisé dans ces mêmes cellules souches nerveuses.

De façon générale, les complexes Swi/Snf sont formés de plusieurs sous-unités. On retrouve néanmoins de manière systématique une sous-unité possédant à la fois un domaine ATPasique (d'où leur nom de « moteurs chromatiniens ») et des homologies avec les hélicases. Chez les mammifères, cette sous-unité centrale est soit Brg1, soit Brm. Par co-immunoprecipitation et TAP-tag, nous avons en outre démontré que la partie cytoplasmique de CRD-NRG interagissait dans les cellules souches nerveuses en culture non seulement avec BAF57 mais aussi avec Brm et non pas Brg1. Les autres sous-unités (BAF pour Brg1/Brm Associated Factors) comportent des domaines d'interaction protéique, des motifs de liaison à l'ADN, ainsi que des bromodomains reconnaissant les lysines acétylées présentes aux extrémités des histones. Ces complexes sont donc capables de « dérouler » l'ADN, de modifier les contacts établis entre celui-ci et les histones et enfin, de mobiliser les nucléosomes grâce à leur sous-unité ATPasique. Les complexes Swi/Snf, en déplaçant la position des nucléosomes sur l'ADN nucléaire, interviennent dans la disponibilité des régions promotrices de gènes vis-à-vis de la machinerie transcriptionnelle (Saha et al., 2006). Par ailleurs, on a récemment démontré que ce complexe Swi/Snf est directement impliqué dans la différenciation neuronale des cellules souches nerveuses (Lessard et al., 2007; Yoo et Crabtree, 2009).

C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à mieux comprendre le rôle de BAF57 au niveau de la différenciation neuronale et oligodendrogliale des cellules souches nerveuses. Nous avons infecté ces dernières à l'aide de lentivirus contenant un shRNA dirigé contre l'expression de BAF57. Cette protéine est impliquée dans la différenciation neuronale des cellules souches nerveuses en culture puisque nous observons une diminution de celle-ci lorsque l'expression de BAF57 est réprimée. D'autre part, la surexpression du domaine intracellulaire de CRD-NRG ne compense pas la diminution de nombre de neurones dans les cellules infectées. En d'autres termes, la différenciation neuronale induite par le domaine intracellulaire de CRD-NRG requiert une interaction avec BAF57, une protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine, ce qui constitue à nos yeux la démonstration d'un effet de ce domaine sur l'expression génique. De manière surprenante, BAF57 n'apparaît pas nécessaire pour l'induction de la différenciation oligodendrogliale par le domaine intracellulaire de CRD-NRG. On doit donc conclure que l'effet du domaine intracellulaire de CRD-NRG sur la différenciation oligodendrogliale des cellules souches nerveuses ne nécessite pas une interaction avec BAF57. Cette constatation permet à la fois d'expliquer un résultat préalable et suscite une hypothèse intéressante. Le résultat préalable qui trouve son

explication à la lumière de cette observation est le fait que le domaine intracellulaire de CRD-NRG est observé dans le noyau de tous les types cellulaires (cellules souches nerveuses, neurones, oligodendrocytes et astrocytes). Nous avions précédemment conclu en disant que la localisation nucléaire du domaine intracellulaire de CRD-NRG n'est pas suffisante pour orienter un destin cellulaire. Le fait que BAF57 ne soit pas nécessaire à la différenciation oligodendrogliale induite par le domaine intracellulaire de CRD-NRG va aussi dans ce sens. Il doit donc exister un niveau supplémentaire de régulation à ce niveau. Ce niveau supplémentaire de régulation pourrait très bien être par exemple une modification post-traductionnelle du domaine intracellulaire l'empêchant (comme dans le cas des oligodendrocytes) ou au contraire le stimulant (comme dans le cas des neurones) à interagir physiquement avec BAF57. Etant donné le nombre de sites potentiels de sérine- et thréonine-phosphorylation qui existent sur la partie intracellulaire de CRD-NRG, cette hypothèse est vraisemblable, ceci d'autant plus qu'existent aussi un site de tyrosine phosphorylation, un site d'interaction avec un domaine de type Forkhead et un domaine d'interaction de type PDZ (analyse *in silico*) (figure 4.2). Il conviendrait dès lors d'étudier ces éventuelles modifications post-traductionnelles du domaine intracellulaire de CRD-NRG dans les différents types cellulaires. De plus, les interactions entre le domaine intracellulaire de CRD-NRG et BAF57, voire Brm pourraient aussi se voir influencées par le domaine intracellulaire des isoformes codées par *Nrg-2* étant donné qu'il peut aussi interagir avec ces deux protéines mais qu'il est incapable de moduler la différenciation neuronale des cellules souches nerveuses.

M E I Y S P D M S E V A G G R S S S P S T Q L S A A P S L D G L P A A E E H I P D T H T E D
 E R S P G L L G L A V **P C C V C L E A E R L R G C L N S E K I C I V P I L A C L V S L C L C I**
 Domaine transmembranaire 1/ Domaine riche en cystéine
 A G L K W V F V D K I F E Y D S P T H L D P G G L G Q D P V I S L D P T A A P A I L V S S E
 A Y T S P V S K A Q S E A G A H V T V Q G D H A A V A S E P S A V P T R K N R L S A F P P
 F H S T A P P F P S P A R T P E V R T P K S G T Q P Q T T E T N L Q T A P K L S T S T S T T
 G T S H L I K **C A E K E K T F C V N G G E C F T V K D L S N P S R Y L C K C P N E F T G D**
 Motif EGF
R C Q N Y V M A S F Y K H L G I E F M E A E E L Y Q K R V L T I T G I C I A L L V V G I M C
 Domaine transmembranaire 2
V V A Y C K T K Q R Q K L H D R L R Q S L R S E R S N L V N I A N G P H H P N P P P E N
 V Q L V N Q Y V S K N V I S S E H I V E R E V E T S F S T S H Y T S T A H H S T T V T Q T P S
 H S W S N G H T E S I I S E S N S V I M M **S S V E N** S R H S S P A G G P R G R L H G L G G
 P R D N S F L R H A R E T P D **S Y R D S P H S E R Y V** S A M T T P A R M **P V D F S** H T P S S
 P K S P P S E M S P P V S S M T V S M P S V A V S P F V E E E R P L L L V T P P R **L R E K K**
Y D H H P Q Q L N S F H H N P A H Q S T S L P P S P L R I V E D E E Y E T T Q E Y E S V Q E
 P V K K V T N S R R A K R T K P N G H I A N R L E M D S N T S S V S **S N S E S E T E D E R**
 V G E D T P F L G I Q N P L A A S L E V A P A F R L A E S R T N P A G R F **S T Q E E L** Q A R
 L S S V I A N Q D P I A V -
 Domaine PDZ

Figure 4.2. Séquence peptidique du domaine extracellulaire de CRD. Les deux domaines transmembranaires sont indiqués en rouge et le domaine EGF en bleu ; les séquences peptidiques en vert correspondent aux différents sites possibles de phosphorylation.

Conclusion

La forme CRD-NRG qui est l'isoforme des Neurégulines-1 exprimée par les cellules souches nerveuses, est donc vraisemblablement impliquée dans un mécanisme d'inhibition latérale. Rappelons que cette hypothèse était basée sur l'existence des deux domaines transmembranaires pour cette isoforme, une particularité structurale unique au sein de la famille des ligands de type EGF. En démontrant que le clivage de cette forme à deux domaines transmembranaires existe dans les cultures de cellules souches nerveuses, que le domaine intracellulaire est alors transloqué dans le noyau de ces cellules où il peut interagir avec deux protéines du complexe de remodelage chromatinien Swi/Snf et que par cette interaction, il stimule la différenciation neuronale de ces cellules, nous confirmons cette hypothèse originale sans toutefois pouvoir la démontrer de manière formelle actuellement. En effet, nous aurions souhaité que la

surexpression de la partie extracellulaire de cette isoforme soit suivie d'une stimulation de la prolifération associée à une diminution de la différenciation des cellules, notamment en neurones et en oligodendrocytes. Il se peut néanmoins que l'absence d'effets observés dans ces expériences de surexpression soit la conséquence d'un mauvais arrangement topologique de la partie N-terminale de CRD-NRG ainsi surexprimée. En effet, le domaine transmembranaire de cette partie N-terminale est particulier puisque situé au sein de la région riche en cystéine (figure 4.2). Il est donc possible que le domaine EGF n'ait pas été correctement positionné et présenté aux récepteurs ErbB2 et ErbB4 des cellules voisines dans les expériences de surexpression.

Un autre argument circonstanciel en faveur de l'hypothèse d'une inhibition latérale dans le chef de CRD-NRG est constituée par le fait que le gène *Nrg-1* est exprimé principalement au cours du développement tandis l'expression du gène *Nrg-2* est plus importante dans les zones neurogéniques chez l'animal adulte (Longart et al., 2004). Or, le mécanisme d'inhibition latérale prédomine au cours du développement. Par ailleurs, chez l'adulte justement, les cellules souches persistantes au sein des zones neurogéniques se différencient principalement en neurones, mais en cas de lésions, les cellules souches nerveuses adultes peuvent participer activement au versant hyperplasique de la réaction gliotique (Kernie et al., 2001 ; Givogri et al., 2006). Il est donc possible que l'isoforme codée par *Nrg-2*, via sa partie extracellulaire puisse jouer un rôle dans ces processus puisque nous observons que la surexpression du domaine extracellulaire de *Nrg-2* dans cellules souches nerveuses cultivées à partir de striatum embryonnaire stimule justement l'acquisition de ces deux destins. Nous pensons donc que plusieurs expériences sont nécessaires ici et devraient être orientées, dans le cas de *Nrg-2*, non plus vis-à-vis de cellules souches nerveuses embryonnaires mais vis-à-vis de cellules souches nerveuses adultes.

Nous souhaiterions conclure en insistant sur le fait que, dans ce travail, nous avons démontré un mécanisme moléculaire permettant de mettre en relation directe des influences extrinsèques avec des influences intrinsèques telles que Edlund et Jessell les avaient définies (Edlund et Jessel, 1999) et pour lesquelles l'importance sur le plan conceptuel est communément admis au cours du développement. Enfin, ce travail nous permet de confirmer et de souligner l'importance des mécanismes de remodelage de la chromatine au cours du développement du système nerveux. Nos résultats pourraient éventuellement permettre d'envisager de nouvelles pistes de réflexion dans la compréhension de diverses affections du système nerveux : d'une part, la possibilité

qu'ont les domaines intracellulaires des isoformes codées par *Nrg-1* et *Nrg-2* d'interagir avec des sous-unités de complexes de remodelage pourrait aider à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'émergence des gliomes de différents grades histologiques (Mueller et von Deimling, 2009). D'autre part, on soupçonne depuis longtemps que les gènes *Nrg* puissent être impliqués dans la pathogénie de la schizophrénie (Harrison et Law, 2006). Il en va de même des gènes codant pour des membres du complexe Swi/Snf (Koga et al., 2009). La démonstration que nous apportons de l'interaction physique et fonctionnelle des protéines codées par les deux groupes de gènes, nous paraît également importante, voire séminale dans l'établissement de nouvelles hypothèses étio-pathogéniques utiles à la compréhension de cette affection.

Références bibliographiques

- Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA** (2003) Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 161:1133-1141.
- Bao J, Lin H, Ouyang Y, Lei D, Osman A, Kim TW, Mei L, Dai P, Ohlemiller KK, Ambron RT** (2004) Activity-dependent transcription regulation of PSD-95 by neuregulin-1 and Eos. *Nat Neurosci* 7(11):1250-8.
- Birchmeier C** (2009) ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp Cell Res* 315(4):611-8
- Breunig JJ, Arellano JI, Macklis JD, Rakic P** (2007) Everything that glitters isn't gold: a critical review of postnatal neural precursor analyses. *Cell Stem Cell* 1(6):612-27
- Calaora V, Rogister B, Bismuth K, Murray K, Brandt H, Leprince P, Marchionni M, Dubois-Dalcq M** (2001) Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro. *J Neurosci* 21:4740-4751
- Chitnis AB** (1995) The role of Notch in lateral inhibition and cell fate specification. *Mol Cell Neurosci* 6(6): 311-21
- Cui Q** (2006) Actions of neurotrophic factors and their signalling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Mol Neurobiol* 33(2): 155-79
- Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA** (2006) The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 186(1):38-53
- Dubois-Dalcq M, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B, Zalc B, Lubetzki C** (2008) From fish to man: understanding endogenous remyelination in central nervous system demyelinating diseases. *Brain* 131:1686-700
- Edlund T, Jessell TM** (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96:211-224
- Eisch AJ, Cameron HA, Encinas JM, Meltzer LA, Ming GL, Overstreet-Wadiche LS** (2008) Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J. Neurosci* 28(46):11785-91
- Elenius K, Choi CJ, Paul S, Santesteban E, Nishi E, Klagsbrun M** (1999) Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidyl inositol 3-kinase. *Oncogene* 18(16):2607-15
- Falke A, frisen J** (2002) Amphiregulin is a mitogen for adult neural stem cells. *J Neursci Res* 69(6):757-62
- Gambarotta G, Garzotto D, Destro E, Mautino B, Giampietro C, Cutrupi S, Dati C, Cattaneo E, Fasolo A, Perroteau I** (2004) ErbB4 expression in neural progenitor cells (ST14A) is necessary to mediate neuregulin-1beta1-induced migration. *J Biol Chem* 279(47): 48808-16
- Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C** (2000) Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* 22:987-996.
- Givogri MI, de Planell M, Galbiati F, Superchi D, Gritti A, Vescovi A, de Vellis J, Bongarzone ER** (2006) Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury. *Dev Neurosci* 28(1-2):81-91
- Guo W-P, Wang J, Li R-X, Peng Y-W.** (2006). Neuroprotective effects of neuregulin-1 in rat models of focal cerebral ischemia. *Brain Research* 1087:180-5.
- Harrison PJ, Law AJ** (2006) Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biol Psychiatry* 60(2):132-40
- Jin K, Sun Y, Xie L, Childs J, Mao XO, Greenberg DA** (2004) Post-ischemic administration of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) reduces infarct size and modifies neurogenesis after focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 24(4):399-408
- Kainulainen V, Sundvall M, Määttä JA, Santesteban E, Klagsbrun M, Elenius K** (2000) A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J Biol Chem* 275(12):8641-9

- Kernie SG, Erwin TM, Parada LF** (2001) Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. *J Neurosci Res.* 66(3):317-26
- Koga M, Ishiguro H, Yazaki S, Horiuchi Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Itokawa M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Kunugi H, Sasaki T, Takahashi M, Watanabe Y, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Muchardt C, Yaniv M, Arinami T.** (2009) Involvement of SMARCA2/BRM in the SWI/SNF chromatin-remodeling complex in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 18(13):2483-94
- Lai C, Feng L** (2004b) Neuregulin induces proliferation of neural progenitor cells via PLC/PKC pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 319:603-611
- Landman N, Kim TW** (2004) Got RIP? Presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:337-351.
- LaVoie MJ, Selkoe DJ** (2003) The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem* 278:34427-34437.
- Lee YS, Silva AJ** (2009) the molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci.* 10(2):126-40
- Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Staahl BT, Wu H, Aebersold R, Graef IA, Crabtree GR** (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron.* 19;55(2):171-3.
- Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A** (2004) Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 472:156-172.
- Mei L, Xiong WC** (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9:437-452.
- Mehler MF** (2008) Epigenetics and the nervous system. *Ann Neurol.* 64(4):602-17
- Moyse E, Segura S, Liard O, Mahaut S, Mechawar N** (2008) Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther.* 3(3):163-84
- Mueller WC, von Deimling A** (2009) Gene regulation by methylation. *Recent Results Cancer Res.* 171:217-39
- Nave KA, Salzer JL** (2006) Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol.* 16(5):492-500.
- Prevot V, Rio C, Cho GJ, Lomniczi A, Heger S, Neville CM, Rosenthal NA, Ojeda SR, Corfas G** (2003) Normal female sexual development requires neuregulin-erbB receptor signaling in hypothalamic astrocytes. *J Neurosci.* 23(1):230-9.
- Rimer M** (2007) Neuregulins at the neuromuscular synapse: past, present, and future. *J Neurosci Res.* 85(9):1827-33.
- Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G** (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19:39-50
- Rogister B, Ben-Hur T, Dubois-Daleq M** (1999) From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 14(4-5):287-300
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR** (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:437-447
- Sale A, Berardi N, Maffei L** (2009) Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci.* 32(4):233-9
- Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA, Corfas G.** (2006) Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell.* 127(1):185-97
- Schaeffer L, de Kerchove d'Exaerde A, Changeux JP** (2001) Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron.* 31(1):15-22

- Schmid RS, McGrath B, Berechid BE, Boyles B, Marchionni M, Sestan N, Anton ES** (2003) Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4251-4256.
- Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S** (1997) Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89(4):629-39
- Tanaka EM, Ferretti P** (2009) Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 10(10):713-23
- Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, Moskowitz MA** (2003) EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest*. 111(8):1125-32
- Villegas R, Villegas GM, Longart M, Hernández M, Maqueira B, Buonanno A, García R, Castillo C.** (2000) Neuregulin found in cultured-sciatic nerve conditioned medium causes neuronal differentiation of PC12 cells. *Brain Res*. 852(2):305-18
- Wang JY, Frenzel KE, Wen D, Falls DL** (1998) Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J Biol Chem*. 273(32):20525-34
- Wang JY, Miller SJ, Falls DL** (2001). The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J Biol Chem* 276:2841-51
- Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW** (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25:79-91
- Yokozeki T, Wakatsuki S, Hatsuzawa K, Black RA, Wada I, Sehara-Fujisawa A** (2007) Meltrin beta (ADAM19) mediates ectodomain shedding of Neuregulin beta1 in the Golgi apparatus: fluorescence correlation spectroscopic observation of the dynamics of ectodomain shedding in living cells. *Genes Cells*. 12(3):329-43.
- Yoo AS, Crabtree GR** (2009) ATP-dependent chromatin remodeling in neural development. *Curr Opin Neurobiol*. 19(2):120-6.

Annexe 1

La neurogenèse adulte ou l'histoire d'un dogme qui s'écroule

Pirotte D, Rogister B.

Rev Med Liege. 2008 63(5-6):245-50

Annexe 2

Neuregulin-1 modulates the differentiation of neural stem cells in vitro through an interaction with the Swi/Snf complex.

Pirotte D, Wislet-Gendebien S, Cloes JM, Rogister B.

Mol Cell Neurosci. 2009 - In Press

Supplementary data

Production of Nrg-1/CRD-NRG monoclonal antibody

As a source for immunization and screening, we used recombinant neuregulin-1 produced by a prokaryotic expression system (*Escherichia coli*). cDNA encoding CRD-NRG was inserted into pcDNA3.1/V5/His-TOPO (Invitrogen°). BL-21 (DE3) *Escherichia coli* (Invitrogen°) was OR [*Escherichia coli* bacteria were??] transformed using this construct, and protein production was initiated by growing a clone in a 500-mL culture of Luria and Bertani (LB) broth overnight at 35 °C. After the optical density (OD) of the 500-mL culture had reached 0.6 (OD 600 nm), induction was initiated with a final concentration of 1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG), and cells were harvested after 2 h of induction. Recombinant proteins were purified using a nickel column in denaturing conditions.

NMRI mice were then immunized by intraperitoneal injection with 50 µg of purified protein with complete Freund's adjuvant over a period of two weeks. Five days before the scheduled fusion, the antigen was administered without adjuvant. Three days after the last injection, 5×10^7 spleen cells were fused with the same number of mouse myeloma in the presence of 50% polyethylene glycol. Hybridomas were selected for growth in HAT medium (IMDM, 5% FCS, 10 µg/ml hypoxanthine).

In order to determine the presence of specific antibody in hybridoma culture supernatants, we performed an ELISA. 96-well plates were coated with 10 mg[WHY ITALICS??]/mL solution of purified recombinant CRD-NRG in coating buffer (14.2 mM Na₂CO₃, 34.9 mM NaHCO₃, 3.1 mM NaN₃), and incubated overnight at 4 °C. The plates were washed with phosphate-buffered saline PBS-Tween (10 mM sodium phosphate, 0.9% saline, Tween-20, pH 7.4). After coating, plates were incubated for 1 hour at 37 °C with blocking solution (milk 2% in PBS-Tween) and then for 1 hour at 37 °C with hybridoma supernatant in PBS-Tween. The plates were again washed three times with PBS-Tween and incubated for 1 h with a 1:30,000 dilution of a rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma, St. Louis, MO) at room temperature. The plates were washed again as before with PBS-Tween and developed by adding 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate diammonium salt (ABTS) (Roche°) substrate in substrate buffer to each well. The plates were incubated at 37 °C for 10 min and were read at 405 nm on a BiotekEL-309 ELISA plate reader.

The D11 clone that gave the highest positive enzyme-linked assay (ELISA) readings for CRD-NRG was chosen for further analysis.

Characterization of Nrg-1/CRD-NRG monoclonal antibody

Sequences of extra- and intracellular domains of CRD-NRG (see also Materials and methods) were cloned and inserted into pcDNA3.1/V5/His-TOPO (Invitrogen°). Plasmid constructions were sequenced. CHO cells were cultured in DMEM containing 10% FCS and were plated on 3 cm² wells at 250,000 cells/well. After 24 hours, cells were transfected with 5 µg of plasmid using Fugene6 (Roche°), following the manufacturer's recommendations. 48 hours after transfection, CHO cells were placed into DMEM with 10% FCS and neomycin to eliminate non-transfected CHO. After two weeks, stable transfected CHO was obtained for ECD and ICD in neomycin supplemented growth medium. Stable transfected CHO cells were plated on polyornithine-coated coverslips. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, and were then permeabilized and blocked (unspecific binding sites) by a 30 min incubation at room temperature in blocking solution (10% donkey serum and 0.3% Triton X-100 in 1X PBS). Cells were then incubated for 1 h at RT with primary antibodies diluted in a 10% donkey serum and 0.1% Triton X-100 in PBS. We used V5 tag antibody (Novius Biologicals°, Littleton, USA; 1:500), D11 monoclonal antibody (1:100) and Nrg-1-ICD antibody (Upstate°; 1:100). Cells were washed and incubated with secondary antibodies: FITC conjugated donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch°, West Grove, USA; 1:500); rhodamine conjugated donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch°, 1:500) or Rhodamine conjugated donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch°, 1:500).

The D11 monoclonal antibody that we raised against recombinant and purified CRD-NRG was used in immunocytofluorescence studies on non-transfected CHO, CHO-ECD and CHO-ICD cells. The monoclonal antibody D11 recognized only CHO-ECD, indicating that the D11 antibody was specific for the ECD of CRD-NRG. Moreover, we also tested the commercial antibody raised against ICD and found that CHO-ICD but not CHO-ECD was recognized (Figure S1). These two antibodies were also tested through western blotting on compartmental protein extractions (see Materials and methods) from CHO, CHO-ECD and CHO-ICD and results showed a specific signal at the awaiting molecular weight in the cytoplasm and membrane of CHO-ECD using D11 monoclonal antibody. The presence of a signal was found only in the

cytoplasm and nucleus of CHO-ICD using the commercial antibody directed against CRD-ICD (Figure S2).

To validate the compartmental protein extraction protocol, we first used specific antibodies: anti-Hsp70 (BD Bioscience[°]; 1:1000), as a marker of the cytoplasmic compartment, anti-flotillin-1 (BD Transduction Lab[°], Erembodegem, Belgium; 1:250), as a marker of lipid-raft associated to the membrane compartment and anti-histone H3 (Upstate[°], Dundee, UK; 1:1000) as a marker for the nuclear fraction (Figure S3). Each protein fraction is specifically labeled by the antibody supposed to recognize a protein known to be present in this compartment. Moreover, no faint non-specific signal could be observed, indicating an absence of cross-contamination between the three compartments.

Figure legends

Figure S1: Immunocytofluorescence on CHO transfected cells with D11 and Nrg-1 ICD antibodies

Using D11 antibody, a signal was only observed in CHO transfected with the plasmid expressing the ECD (CHO-ECD) sequence of Nrg-1. Inversely, the commercial antibody directed against the intracellular domain showed a signal only in CHO cells transfected with the plasmid expressing the intracellular sequence of Nrg-1 (CHO-ICD), indicating that both antibodies recognize specifically the amino-terminal or carboxy-terminal extremity of Nrg-1.

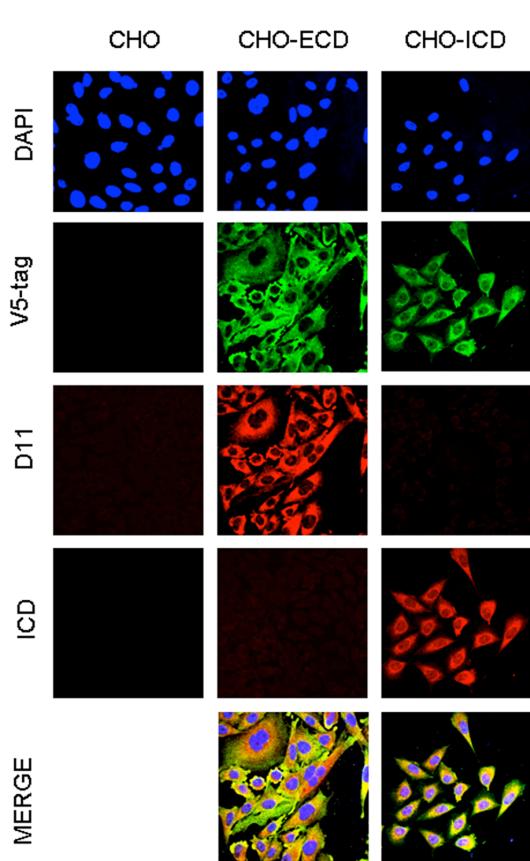
Figure S2: Western blot on compartmental extraction from transfected CHO cells

Using D11 antibody, a signal was present in the cytoplasm and membrane protein extracts of CHO-ECD, suggesting that this truncated protein form may be anchored in the membrane. The commercial antibody directed against ICD did not recognize any protein in CHO-ECD. In contrast, a signal corresponding to the intracellular domain was only present in the cytoplasm and nucleus protein extract of CHO-ICD using the commercial antibody directed against ICD. No signal was observed in CHO-ECD protein extracts with this antibody. Moreover, these results indicate that ICD is able to translocate into the nucleus of CHO but that this truncated form is unable to be anchored in the membrane, probably due to the absence of part of the transmembrane domain.

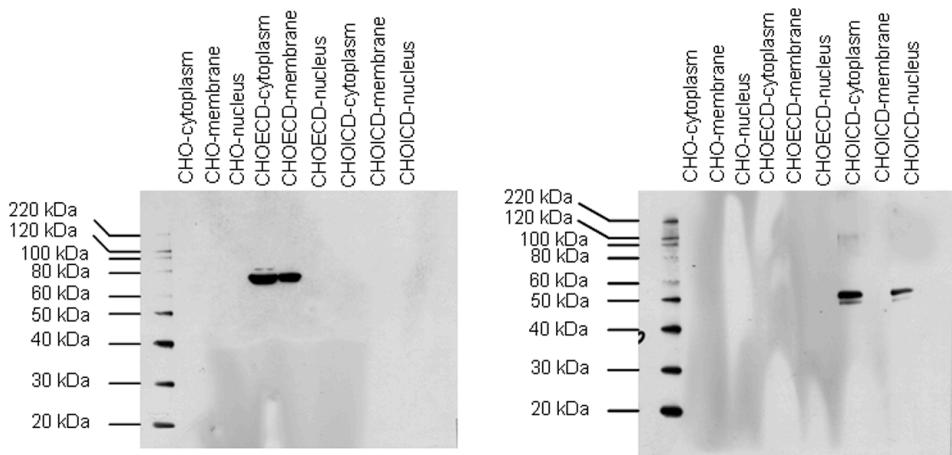
Figure S3: Validation of compartmental protein extraction

Western blots on compartmentally-extracted proteins from neural stem cells showed specific localization of Hsp70, Flotillin-1 and Histone H3 in respectively cytoplasmic (fraction IV), membrane (fraction V) and nuclear fraction (fraction III) (fraction numbers are described in Materials and Methods). Moreover, these antibodies did recognize, even at a low level, their antigen in the non awaited protein extracts, indicating the virtual absence of cross-contamination between the three protein extracts.

Supplementary data figure 1



Supplementary data figure 2



Supplementary data figure 3

